

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANILO SANTOS EUGÊNIO

PLASTICIDADE METABÓLICA E FISIOLÓGICA DO PEIXE ANTÁRTICO *Notothenia rossii* (RICHARDSON 1844) ACLIMATADO A ALTAS TEMPERATURAS

CURITIBA  
2012

DANILO SANTOS EUGÊNIO

PLASTICIDADE METABÓLICA E FISIOLÓGICA DO PEIXE ANTÁRTICO *Notothenia rossii* (RICHARDSON 1844) ACLIMATADO A ALTAS TEMPERATURAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucélia Donatti

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues

CURITIBA  
2012

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Eugênio, Danilo Santos

Plasticidade metabólica e fisiológica do peixe antártico *Notothenia rossii* (Richardson 1884) aclimatado a altas temperaturas. / Danilo Santos Eugênio. – Curitiba, 2012.

73 f.: il., color. ; 30cm.

Orientador: Lucélia Donatti

Co-orientador: Edson Rodrigues

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Peixe – Antártica 2. Metabolismo energético I. Título II. Donatti, Lucélia III. Rodrigues, Edson IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 597

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

---

## DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Danilo Santos Eugênio**, no dia 27 de Fevereiro de 2012, no Setor de Ciências Biológicas (UFPR) defendeu sua Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, intitulada: "**Plasticidade metabólica e fisiológica do peixe antártico *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) aclimatado a altas temperaturas**", com a banca examinadora constituída, pelos professores: Dra. Maria Eliane Merlim Rocha (UFPR), Dra. Viviane Prodócimo (UFPR), e Dra. Lucélia Donatti (da UFPR), como orientador e presidente da Banca Examinadora), e foi Aprovada.

A solicitação de emissão do Diploma de Mestre em Biologia Celular e Molecular ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Esta declaração tem validade de 60 (sessenta) dias.

Curitiba, 27 de Fevereiro de 2012



  
Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular - UFPR  
Matr. 185795

Dedico este trabalho à minha mãe, que sempre foi e sempre será meu exemplo;  
À minha querida e adorável esposa, Luciana e as nossas filhas Camilla e Isabella;  
Aos meus irmãos Demétrios e Danieli.

## AGRADECIMENTO

À Dra Lucélia Donatti pela oportunidade de iniciar de fato minha vida científica, pela sua paciência, orientação e por toda a contribuição realizada neste projeto.

Ao Dr Edson Rodrigues, pela importante contribuição neste processo, na sugestão das análises enzimáticas, na disponibilização do laboratório e na orientação nos ensaios bioquímicos. Você é para mim um exemplo a ser seguido de dedicação, esforço, abdicação e competência.

Ao Dr Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro cuja contribuição nas avaliações dos relatórios foi muito importante. Devido as suas observações pude evoluir bastante, porém, sei que ainda há muito a ser feito. Enfim, você sabe quão importante foi sua parcela. Espero que volte a encontrar pessoas com a sua qualidade profissional nesta caminhada

A todos os integrantes que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Biologia Adaptativa da UFPR e do Laboratório de Bioquímica da Unitau. Não se faz pesquisa em local tão inóspito e distante sem a contribuição de muitas pessoas.

A todas as meninas que realizaram os bioensaios, a separação dos tecidos e análise bioquímica do sangue na EACF: Cintia, Luciana, Flavia e Tânia, o meu muito obrigado! Sabemos que é impossível trabalhar em pesquisas antárticas sem o esforço mútuo. Sei o quanto a contribuição de vocês foi grande e de extrema importância para este trabalho.

Um agradecimento muito especial a todos que contribuíram para o aprendizado prático na execução deste trabalho: Ao Edinho e à Mariana por toda a paciência e dedicação no ensino das análises enzimáticas; à Luciana e ao Anderson nas análises bioquímicas no Laboratório de Biologia Adaptativa; à Maria Eugenia, no Laboratório de Bromatologia e ao Ricardo Augusto Cerboncini pela instrução e auxílio na execução das análises de Bioestatística.

Ao Ronaldo e a Kelly, pois possibilitaram que as análises em Taubaté fossem realizadas no menor intervalo possível e ainda tiveram a paciência de lavar as vidrarias que eu utilizava sem maldizer as minhas gerações anteriores e futuras.

Agradeço também ao Ronaldo e a Mariana pela ajuda especial na hora do almoço... vocês cozinham muito bem... rsrs

À Gabi e à Camile pela amizade, companheirismo, apoio e parceria. Obrigado pelos conselhos, pela presença e pela força que vocês me deram. Nossa amizade sempre ficará na minha memória. Agradeço a Deus por ter conhecido vocês!

À Rafaela pela valiosa amizade e por todas as longas conversas. Com você descobri que existem amigos que são promovidos a irmãos.

A todos do departamento de Biologia Celular da UFPR.

À Stelle pela amizade, companhia, conselhos e torcida. Você é muito especial para mim!

Ao Claudemir esse grande amigo, cuja amizade foi crucial nesta caminhada, afinal esteve presente desde o primeiro dia até agora, sempre me motivando e inspirando confiança.

Ao Dr Manoel Toth Quitilham que me ajudou na decisão de realizar o mestrado e inclusive, mesmo sem me conhecer, me emprestou o *The Cell* para que eu pudesse estudar para a prova de seleção.

Ao Dr Luis Fernando Favaro pela amizade, apoio e conselhos durante todo este tempo e especialmente em março de 2012 quando fiquei todo perdido sem saber se continuava ou não na pesquisa. Muito obrigado por ter paciência de me ouvir e pelos conselhos.

Ao Professores Ciro, Lia, Edvaldo, Viviane e Maria Eliane, pela contribuição de cada um na avaliação deste trabalho em suas diferentes etapas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR e aos Professores que contribuíram de alguma maneira até aqui.

À SECIRM, aos militares da Marinha, aos integrantes do Arsenal de Marinha, aos militares da Força Aérea e a todos os demais envolvidos na realização das pesquisas antárticas brasileiras.

Ao CNPq e ao REUNI pelo financiamento da pesquisa realizada.

À Elizabeth Souza Cunha, pois, me deu importante incentivo na correção final do trabalho após a leitura e revisão.

À Luciana, essa mulher que se faz cada vez mais importante na minha vida pelo seu amor incondicional e contagiante. Sua companhia durante esses anos é insubestimável, obrigado pelo apoio, por sua dedicação, pela compreensão durante os meses de ausência que foram muitos: as análises em Taubaté, o treinamento no Rio e o período na Antártica. Essa conquista é nossa!

À Camilla, minha filha, que é uma gigante pra mim. Saiba que você trouxe equilíbrio para vida do papai. Desde que você nasceu posso dizer que achei um norte para me orientar e no mesmo ano decidi fazer a graduação em biologia, portanto, a obtenção deste título hoje é apenas a continuação da caminhada. Muito obrigado!

À minha mãe Nely, saiba que seus conselhos foram ouvidos, suas palavras não foram em vão e que seu trabalho, sua dedicação geraram frutos. Só você sabe como foi difícil até aqui, todas as coisas das quais você abriu mão para a educação dos filhos.

Aos meus irmãos Demétrios e Danieli, pelo carinho, pela força e por sempre torcerem por mim. Vocês são muito importantes na minha vida, nós crescemos juntos e hoje essa conquista é de vocês também. Amos vocês.



## RESUMO

Para indivíduos marinhos a temperatura é um importante fator abiótico e os nichos de espécies ectotérmicas são definidos biogeograficamente de acordo com as restrições e compensações envolvidas na adaptação térmica. O aquecimento acelerado da Península Antártica e ilhas adjacentes têm suscitado questões sobre a plasticidade térmica de espécies ectotérmicas antárticas. Peixes antárticos apresentam diversos mecanismos importantes para a sobrevivência em ambientes com temperaturas próximas à -2°C, com gelo na superfície da água e em vias de congelamento. Em sua ictiofauna destacam-se os peixes pertencentes à subordem Notothenioidei, um grupo de peixes que domina a biomassa marinha antártica. Dentre essas espécies destaca-se a *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) devido à ampla distribuição na costa circum-Antártica, representando uma das quatro espécies de maior ocorrência na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica, local deste estudo. Com o objetivo de avaliar as respostas fisiológicas e o perfil metabólico da espécie *N. rossii* frente ao estresse térmico a temperaturas elevadas foram realizados bioensaios na Estação Antártica Comandante Ferraz, durante os invernos de 2009 e 2010. Os peixes foram aclimatados nas temperaturas de 0, 4 e 8°C durante 24, 96, 360 e 720 horas. Nos tecidos hepáticos e musculares, foi analisada a percentagem de umidade e minerais, a concentração tecidual dos substratos energéticos e a atividade de enzimas representantes do metabolismo energético e oxidativo, observando também os constituintes plasmáticos. Na aclimação da *N. rossii* em 8°C, a elevação dos níveis de glicose-6-fosfatase (G6Pase) ficou evidente a partir do tempo de 96 h em relação ao observado em 0°C e foi acompanhada de hiperglicemia em todos os tempos analisados. Por outro lado, as concentrações de glicogênio muscular e hepático foram inferiores aos valores de referência (0°C) com diferença mínima de 41%. Na exposição a 4°C após 96 h a glicemia foi 48% inferior ao observado em 0°C, sendo, 57 e 73% abaixo em 360 e 720 h respectivamente. Ainda referente aos mesmos tempos a concentração hepática de glicogênio em 4°C superou em 21% o observado em 0°C, enquanto a atividade da G6Pase aumentou apenas em 720 h de exposição. A modulação positiva dos níveis de G6Pase no fígado da *N. rossii* na aclimação a 8°C indica um aumento do potencial gliconeogênico desse tecido e a sua capacidade exportadora de glicose para o sangue. Contudo, esse efeito não ficou evidente em 4°C onde a *N. rossii* mostrou incapacidade de manter a sua glicemia. Embora estenotérmico *N. rossii* foi capaz de sobreviver na temperatura de 8°C durante 30 dias demonstrando sua plasticidade térmica. Apesar de ter evoluído sob temperaturas baixas e estáveis possui mecanismos de resposta à elevação da temperatura do meio, porém, estas são diferenciadas entre 4°C e 8°C.

Palavras-chave: Peixes antárticos. Estresse térmico. Metabolismo energético. Estresse oxidativo. Cinética enzimática. *Notothenia rossii*. Glicose-6-Fosfatase.

## ABSTRACT

The temperature is an abiotic important factor for marine species and the niches of ectothermic species are biogeographically defined according to the constraints and tradeoffs involved in thermal adaptation. The accelerated warming of the Antarctic Peninsula and adjacent islands has raised questions about the thermal plasticity in Antarctic ectothermic species. Antarctic fish have several important mechanisms for survival in environments with temperatures close to  $-2^{\circ}\text{C}$ , with ice on the water surface and near the freezing point. The suborder Notothenioidei is a group of fish that dominates the Antarctic marine biomass, among these species there is the *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) with wide distribution in the circum-Antarctic coast, it representing one of the four most frequent species in the Admiralty Bay, King George Island, Antarctic Peninsula. The objective of this study was to evaluate the physiological and metabolic profile of *N. rossii* in warm acclimation. Experiments were conducted in Comandante Ferraz Brazilian Antarctic Station during the winters of 2009 and 2010. The fish were acclimated at temperatures of the 0, 4 and  $8^{\circ}\text{C}$  during 24, 96, 360 and 720 hours. In liver and muscle tissues, we analyzed the percentage of moisture and minerals, the concentration of energy substrates in tissues and enzyme activity representatives of energy metabolism and oxidative, noting also plasma constituents. At  $8^{\circ}\text{C}$  *N. rossii* there was high levels of glucose-6-phosphatase (G6Pase) from the time of 96 h compared to that observed at  $0^{\circ}\text{C}$  and it was accompanied by hyperglycemia at all times analyzed. On the other hand the concentrations of muscle and liver glycogen were lower than reference values ( $0^{\circ}\text{C}$ ) with minimal difference of 41%. After 96 h of exposure at  $4^{\circ}\text{C}$  the blood glucose was 48% lower than that at  $0^{\circ}\text{C}$ , being respectively 57 and 73% lower at 360 and 720 h. In the same time of acclimatization the concentration of hepatic glycogen at  $4^{\circ}\text{C}$  exceeded 21% that the observed at  $0^{\circ}\text{C}$  and G6Pase activity increased only at 720 h of exposure. The upregulation in the activities of liver G6Pase of *N. rossii* in acclimation to  $8^{\circ}\text{C}$  indicates an increase in the gluconeogenic potential of this tissue and his capacity to export glucose to the blood. However, this effect was not evident at  $4^{\circ}\text{C}$  where the *N. rossii* showed inability to maintain blood glucose levels. Although stenothermic, *N. rossii* was able to survive at temperature of  $8^{\circ}\text{C}$  for 30 days demonstrating their thermal plasticity. Despite having evolved under temperatures low and stable, this fish has response mechanisms to the increase in temperature of the environment however these responses vary between  $4^{\circ}\text{C}$  and  $8^{\circ}\text{C}$ .

**Keywords:** Antarctic Fish. Thermal stress. Energy metabolism. Oxidative stress. Enzyme kinetics. *Notothenia rossii*. Glucose-6-Phosphatase.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapas do Continente Antártico.....	15
Figura 2 – Representação esquemática do peixe antártico <i>Notothernia rossii</i> .....	19
Figura 3 – Mapa da Baía do Almirantado indicando os locais de coleta .....	26
Figura 4 – Meios de coleta .....	27
Figura 5 - Módulo de aquários da EACF .....	28
Figura 6 – Curva de referência de glicose .....	32
Figura 7 – Curva de referência de albumina bovina sérica .....	33
Figura 8 – Curva de referência de NADH .....	38
Figura 9 – Curva de referência da enzima citrato sintase .....	39
Figura 10 – Curva de referência de fosfato inorgânico .....	39
Figura 11 – Variações dos constituintes plasmáticos .....	42
Figura 12 - Variação da hemoglobina .....	44
Figura 13 - Conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	45
Figura 14 - Conteúdo proteico do fígado e músculo. ....	46
Figura 15 - Conteúdo de lipídeo hepático e muscular .....	47
Figura 16 – Massa seca, umidade e minerais nos tecidos hepático e muscular.....	48
Figura 17 – Atividade enzimática dos tecidos hepático e musculares.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	– Acetilcoenzima A
AFGP	– Glicoproteínas anticongelantes (do inglês <i>Anti Freeze Glico Proteins</i> )
AMC	– Adaptação Metabólica ao Frio
AMPc	– Adenosina monofosfato cíclica (do inglês <i>Cyclic adenosine monophosphate</i> )
BCA	– Ácido bicincronínico (do inglês <i>Bicinchoninic acid</i> )
CS	– Citrato sintase
DNA	– Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DP	– Desvio padrão
DTNB	– Ácido nitrobenzóico (5,5'- Ditio-bis-(ácido 2-nitrobeizóico))
EACF	– Estação Antártica Comandante Ferraz
EC	– Comissão de Enzimas (do inglês <i>Enzyme Commission</i> )
EDTA	– Ácido etileno diamino tetraacético (do inglês <i>Ethylenediaminetetracetic acid</i> )
G6Pase	– Glicose-6-fosfatase (do inglês <i>Glucose-6-phosphatase</i> )
GAAM	– Grupo de Assessoramento Ambiental
GK	– Glicoquinase (do inglês <i>Glucokinase</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	– Peróxido de hidrogênio
HK	– Hexoquinase (do inglês <i>Hexokinase</i> )
k <sub>cat</sub>	– Constante que representa a eficiência da atividade catalítica de uma enzima
K <sub>m</sub>	– Constante de Michaelis-Menten para uma enzima e expressa a relação entre a concentração inicial de substrato e enzima no estado estacionário
LDH	– Lactato desidrogenase (do inglês <i>Lactate dehydrogenase</i> )
MUFA	– Ácido graxo monoinsaturado (do inglês <i>Monounsaturated fatty acid</i> )
PUFA	– Ácido graxo poliinsaturado (do inglês <i>Poliunsaturated fatty acid</i> )
MDH	– Malato desidrogenase (do inglês <i>Malate dehydrogenase</i> )
NAD <sup>+</sup>	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (do inglês <i>Oxidized nicotinamide adenine dinucleotide</i> )
NADH	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (do inglês <i>Reduced nicotinamide adenine dinucleotide</i> )
NBT	– Cloreto de azul de nitrotetrazólio (do inglês <i>Nitro Blue Tetrazolium</i> )
ROS	– Espécie reativa de oxigênio (do inglês <i>Reactive oxygen species</i> )
SOD	– Superóxido dismutase
SCAR	– Comitê Científico sobre Pesquisa Antártica (do inglês <i>Scientific Committee on Antarctic Research</i> )
U	– Unidades Internacionais de enzimas
UFPR	– Universidade Federal do Paraná
UNITAU	– Universidade de Taubaté
λ	– Comprimento de onda
ε	– Coeficiente de extinção

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1 CONTINENTE ANTÁRTICO .....	16
2.2 PEIXES ANTÁRTICOS .....	18
2.3 METABOLISMO DE PEIXES ANTÁRTICOS .....	19
2.4 ESTADO REDOX DOS PEIXES ANTÁRTICOS .....	22
2.5 EFEITOS DA VARIAÇÃO TÉRMICA .....	23
<b>3 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>25</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO.....	26
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	27
4.3 DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES PLASMÁTICOS.....	29
4.3.1 Metabólitos não proteicos .....	29
4.3.2 Eletrólitos não proteicos .....	30
4.3.3 Metabólitos proteicos .....	30
4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS SUBSTRATOS ENERGÉTICOS TECIDUAIS .....	30
4.4.1 Glicogênio total.....	30
4.4.2 Proteínas totais .....	31
4.4.3 Curvas de referências para determinações de glicogênio.....	32
4.4.3 Curvas de referências para determinações de proteínas totais .....	32
4.4.3 Lipídeos Totais .....	33
4.4.4 Determinação de massa seca e umidade .....	34
4.5.1 Determinação de minerais .....	34
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	34
4.5.1 Obtenção do homogeneizado .....	34
4.5.2 Determinação da atividade da MDH.....	35
4.5.3 Determinação da atividade da CS.....	35
4.5.4 Determinação da atividade da LDH.....	36

4.5.5 Determinação da atividade da SOD .....	36
4.5.6 Determinação da atividade da G6Pase .....	37
4.5.7 Curvas de referências para as determinações enzimáticas .....	38
4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....	40
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
5.1 CONSTITUINTES PLASMÁTICOS .....	41
5.2 HEMOGLOBINA.....	43
5.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA TECIDUAL.....	44
5.3.1 Glicogênio .....	44
5.3.2 Proteínas.....	46
5.3.3 Lipídeos.....	46
5.3.4 Massa Seca, Umidade e Minerais.....	47
5.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	49
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO I – TABELAS DE RESULTADOS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO II – TABELA COM O n AMOSTRAL EM CADA ANÁLISE .....</b>	<b>74</b>

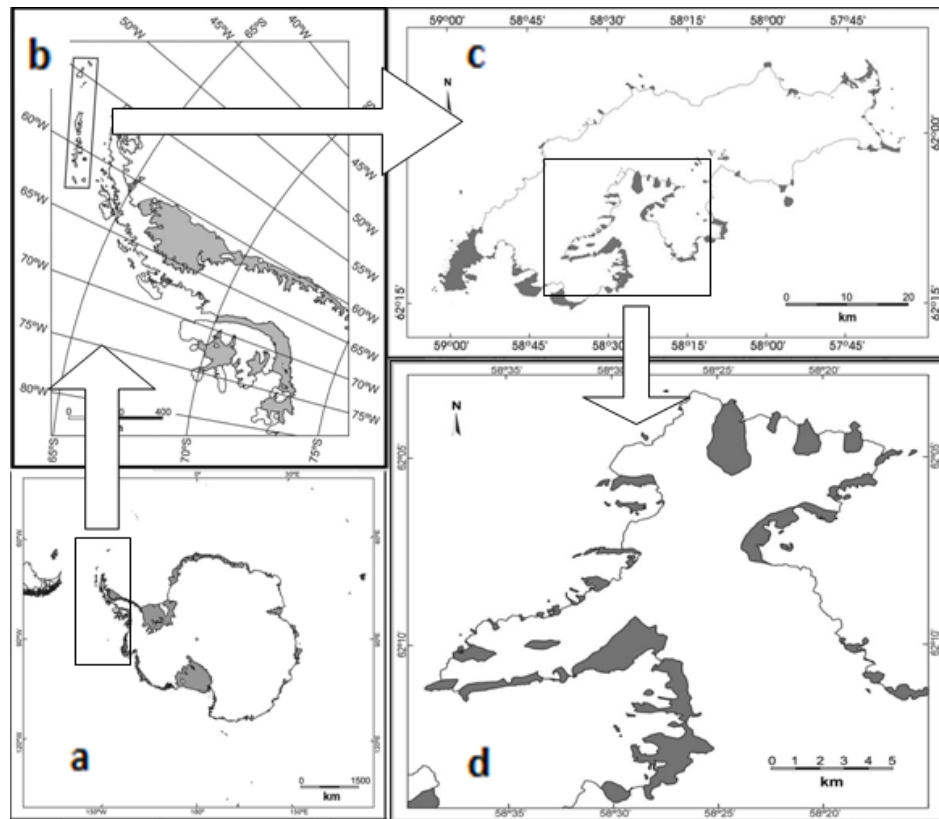
## 1 INTRODUÇÃO

Em organismos marinhos a temperatura é um fator abiótico importante devido ao forte impacto que exerce sobre os processos biológicos (LUCASSEN *et al.*, 2003). A capacidade de suportar as variações de temperatura define biogeograficamente nichos de espécies ectotérmicas aquáticas, de acordo com as restrições e compensações envolvidas na adaptação térmica (PORTNER, 2001; 2002).

Na Antártica são encontradas as condições térmicas mais extremas do planeta e a temperatura corpórea dos peixes são próximas ao ponto de congelamento (EASTMAN, 1993; SOMERO, 2004). Em sua ictiofauna destacam-se os peixes pertencentes à família Nototheniidae, uma das cinco com maior ocorrência nos mares Austrais, todas elas incluídas na subordem Notothenioidei, um grupo de peixes que domina a biomassa antártica marinha (EASTMAN, 1993).

Dentre as espécies de peixes antárticos a *Notothenia rossii*, endêmica da região, é uma das quatro espécies de maior ocorrência da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica, local deste estudo (FISCHER e HUREAU, 1985). Essa espécie é considerada importante para a pesca industrial, sendo capturada devido à qualidade da sua carne e de seus ovos (FISCHER e HUREAU, 1985). No início da década de 1970, os estoques de *N. rossii* estavam esgotados, conduzindo à adoção de medidas especiais de conservação e, atualmente, sua pesca comercial é proibida até que haja recuperação de seus estoques (CCAMLR, 2011).

As ilhas sub-antárticas (FIGURA 1a, 1b - retângulo), dentre elas a Ilha Rei George (FIGURA 1c), abrigam uma fauna bem adaptada às baixas temperaturas e às condições tróficas da região. Contudo, a proximidade geográfica com a fronteira polar Antártica faz com que estas ilhas tornem-se vulneráveis a eventuais mudanças ambientais decorrentes do aquecimento da região. Clarke e colaboradores (2007) relatam que a região da Península Antártica, juntamente com o Ártico e um região central da Sibéria, é uma das três regiões do planeta que vem sofrendo aquecimento acelerado, tendo aquecido 1,5°C entre 1950 a 2006, contra 0,6°C do restante do planeta. Por outro lado, ao longo dos últimos 50 milhões de anos a Antártida resfriou lentamente em 0,03°C em média a cada 100.000 anos (EASTMAN, 1993).



**Figura 1** – Mapas do Continente Antártico. (a) Antártica, (b) Península Antártica e ilhas sub-antárticas destacadas no retângulo, (c) Ilha Rei George e (d) Baía do Almirantado destacada pelo quadrado em (c).

FONTE: Modificado de Simões *et al.* (2004).

As consequências do aquecimento global na Antártica, principalmente na Península Antártica, vem provocando degelo intenso de geleiras, da neve acumulada durante o inverno e do gelo marinho, levando a alterações na salinidade e na densidade da água do mar, especialmente em regiões costeiras, causando também a exposição de habitats que antes ficavam cobertos de gelo (DI PRISCO, 2000; CLARKE *et al.*, 2007).

Diante do exposto acima, é importante elucidar os mecanismos morfofisiológicos e a plasticidade metabólica dos peixes antárticos envolvidos nas possíveis alterações de temperatura e estresse térmico a altas temperaturas, fornecendo subsídios que poderão contribuir para a tomada de decisão em relação aos ecossistemas e organismos sujeitos a estas alterações. Diversos estudos analisaram o efeito da elevação da temperatura em peixes antárticos, no entanto, este trabalho pretende ampliar o conhecimento do efeito da aclimação com



temperaturas acima do limite letal em peixes antárticos, utilizando como objeto de estudo a *N. rossii*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONTINENTE ANTÁRTICO

A formação do continente Antártico remonta ao período Jurássico e iniciou-se com a separação do supercontinente Gondwana (190 a 135 milhões de anos) e por volta de 35 milhões de anos atrás, a deriva de um dos fragmentos deste supercontinente o levou a sua posição polar atual (CLARKE, 1983; EASTMAN, 1993). Em um período histórico próximo a 25 milhões de anos ocorreu um dos eventos mais importantes para a fauna marinha da região, o surgimento da Corrente Circumpolar Antártica. Isto foi possibilitado pela separação definitiva dos continentes do sul através da abertura da Passagem do Drake, formando assim o Oceano Circum-Antártico ou Oceano Austral (NORTH, 1991).

Durante os últimos 55 milhões de anos, a temperatura do Oceano Austral sofreu uma diminuição gradual, especialmente após a abertura do Drake, passando de cerca de 20°C, neste período, até as temperaturas extremas atuais, em média - 1,8°C (CLARKE, 1983), gerando forte pressão seletiva na composição faunística através das baixas temperaturas e da sazonalidade. Com o consequente isolamento geográfico da região, a moderna fauna Antártica evoluiu isolada das demais regiões do planeta (EASTMAN, 1993).

O ambiente marinho Antártico ocupa aproximadamente 35 milhões de Km<sup>2</sup> e concentra algo em torno de 322 espécies de peixes distribuídas em 50 famílias (EASTMAN, 2005). Considerando que foram encontradas 16.764 espécies de peixes nos ambientes marinhos localizados em diferentes regiões do planeta (ESCHMEYER *et al.*, 2010), o Oceano Circum-Antártico representa, com toda a sua diversidade, apenas 1,92% dessas espécies.

Devido às baixas temperaturas os mares antárticos exibem elevada solubilidade de oxigênio (CROCKETT, 2011), todavia, este não foi o único fator seletivo e determinante de sua biodiversidade. O confinamento ecológico e a oscilação sazonal do suprimento alimentar (EASTMAN, 1993), parcialmente

explicada pela limitação sazonal de luminosidade (COOMBS e MONTGOMERY, 1994), também são apontados como fatores importantes para explicar a pequena variedade de peixes antárticos (EASTMAN, 1991). Outro aspecto importante reside na estabilidade térmica do meio, em especial das zonas de gelo marinho permanente, a qual pode ter sido de extrema importância para o processo de seleção e adaptação molecular dos organismos Antárticos (EASTMAN, 1991; HUBOLD, 1991; MONTGOMERY e CLEMENTS, 2000).

A ictiofauna antártica apresenta diversos mecanismos importantes para a sobrevivência em ambientes com temperaturas próximas à  $-2^{\circ}\text{C}$ , com gelo na superfície da água e em vias de congelamento (EASTMAN, 1993). Podemos citar a estenotermia (SOMERO *et al.*, 1996; VAN DIJK *et al.*, 1999; BRODTE *et al.*, 2008), a escassez de hemoglobina, ou ausência em algumas espécies (DI PRISCO *et al.*, 2007), a compensação cardiovascular (O'BRIEN e SIDELL, 2000), a presença de glicoproteínas com propriedades anticongelantes (AFGPs - *Anti Freeze Glico Proteins*) (CHEN *et al.*, 1997a; b; HARDING *et al.*, 2003; JIN e DEVRIES, 2006), os rins aglomerulares (EASTMAN, 1993), o aumento na concentração de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) (BOTTINO *et al.*, 1967; GIESEG *et al.*, 2000; BRODTE *et al.*, 2008; CROCKETT, 2011), o armazenamento intracelular de triacilgliceróis e extensas redes de membranas celulares (CROCKETT, 2011).

De acordo com a teoria da alocação (LEVINS, 1968), espécies adaptadas a temperaturas estáveis, chamadas de estenotérmicas, especializaram-se em otimizar o desempenho fisiológico e metabólico na estreita faixa de variação climática do ambiente em que vivem. Por outro lado espécies euritérmicas, cujos habitats apresentam larga variação térmica, são capazes de realizar ajustes fisiológicos de acordo com a ampla gama de condições ambientais encontradas em seus nichos (WILSON e FRANKLIN, 2002). Acredita-se que espécies estenotérmicas perderam a capacidade de responder às mudanças ambientais (HUEY e HERTZ, 1984; SOMERO *et al.*, 1996) e especificamente a respeito de peixes antárticos, por habitarem regiões com temperaturas extremas, porém, sob condições relativamente estáveis, entende-se que tais espécies são adaptadas ou especializadas ao frio (HOCHACHKA e SOMERO, 1968; WILSON *et al.*, 2002; JOHNSTON, 2003).

Um marco importante no processo para elucidar a capacidade adaptativa de peixes antárticos foi à utilização de indicadores bioquímicos capazes de avaliar as

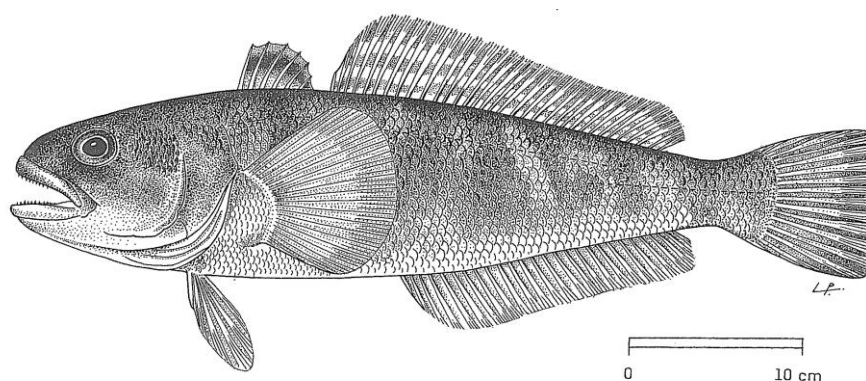
condições do organismo no momento em que foram amostrados ou recolhidos (DAHLHOFF, 2004). Estes indicadores evidenciam a atividade metabólica de componentes chaves relacionados direta ou indiretamente a processos importantes na sobrevivência ou reprodução dos organismos (TORRES *et al.*, 1994; DAHLHOFF, 2004). Tais estudos foram primariamente utilizados sob um contexto fisiológico em peixes antárticos (SOMERO e HOCHACHKA, 1968; WALESBY e JOHNSTON, 1979; TORRES e SOMERO, 1988; DAHLHOFF, 2004) e, desde então, têm contribuído amplamente para a compreensão de processos enzimáticos do metabolismo energético e oxidativo em diversos organismos (CHILDRESS e SOMERO, 1979; PELLETIER *et al.*, 1993; KAWALL *et al.*, 2002; SEEBACHER *et al.*, 2005; CROCKETT, 2011; GHISI *et al.*, 2011).

## 2.2 PEIXES ANTÁRTICOS

Peixes antárticos apresentam elevada capacidade adaptativa às condições extremas da região, por outro lado, sua pesca industrial tem levado ao esgotamento do estoque de algumas espécies de peixes. Em águas rasas da antártica (profundidade menor que 1000m) os peixes pescados pertencem a uma fauna limitada (TARGETT, 1981; EASTMAN, 1985). 70% das espécies e 90% dos indivíduos fazem parte de quatro famílias da subordem Notothenioidei e 95% dessas espécies são endêmicas da Antártica (DEWITT, 1971). Muitos destes peixes pertencem às famílias Nototheniidae e Chaenichthyidae, que geralmente são sedentários, com hábitos bentônicos (TARGETT, 1981), possuem longo ciclo de vida, reduzida taxa de fecundidade e com crescimento mais lento que outras espécies de peixes que habitam águas geladas (EVERSON, 1977).

*N. rossii* (FIGURA 2) é um dos peixes antárticos mais valiosos para a pesca industrial devido à qualidade de sua carne e ovos (FISCHER e HUREAU, 1985). No início dos anos 1970 seus estoques foram severamente esgotados, sendo que sua pesca ultrapassou 400.000 toneladas por ano. Por outro lado, nos anos seguintes não alcançou 3.000 ton (FISCHER e HUREAU, 1985). Medidas de conservação foram adotadas (FISCHER e HUREAU, 1985; BARRERA-ORO *et al.*, 2010) e hoje sua pesca comercial está proibida até a recuperação dos seus estoques (CCAMLR, 2011).

Além da importância econômica a *N. rossii*, membro da família Nototheniidae, é endêmica da região e apresenta ampla distribuição na costa circum-Antártica e em águas do Arco Scotia (GON e HEEMSTRA, 1990). Possui hábitos carnívoros (BARRERA-ORO *et al.*, 2010) e é uma das quatro espécies de maior ocorrência na Baía do Almirantado.



**Figura 2** – Representação esquemática do peixe antártico *Notothenia rossii*.  
 FONTE: Fisher e Hureau (1985).

### 2.3 METABOLISMO DE PEIXES ANTÁRTICOS

A compensação metabólica quanto às baixas temperaturas em peixes antárticos é observada na eficiência enzimática, com valores reduzidos da constante de Michaelis-Menten ( $K_m^a$ ) e elevada atividade catalítica ( $k_{cat}^b$ ) (CLARKE, 2003; SOMERO, 2004). Diante das limitações térmicas, outra evidência da adaptação a baixas temperaturas é o enriquecido conteúdo enzimático mitocondrial (LONDRAVILLE e SIDELL, 1990; O'BRIEN e SIDELL, 2000), que como principal local gerador de ATP possibilita a produção de moléculas armazenadoras de energia química em consonância com as exigências e demandas metabólicas teciduais (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Analisando a Adaptação Metabólica ao Frio (AMC) as enzimas Citrato Sintase (CS) e Lactato Desidrogenase (LDH), foram observadas em tecidos encefálicos de peixes antárticos e tropicais e subtropicais. Observaram-se elevada

<sup>a</sup>  $K_m$  é a constante de Michaelis-Menten e fornece um parâmetro de especificidade (Crocket, 2011). Quanto menor o  $K_m$ , maior a especificidade enzima-substrato.

<sup>b</sup> O  $k_{cat}$  de uma enzima é uma constante da taxa catalítica e indica sua eficiência metabólica representando o valor máximo de reações enzimáticas catalisadas por segundo (Nelson e Cox, 2008).

concentração enzimática e atividade catalítica de ambas as enzimas em peixes antárticos ficou evidente a presença da AMC (KAWALL *et al.*, 2002). Contudo, em outro estudo que comparou a enzima CS e o sistema de defesa antioxidante no encéfalo e no coração de notothenídeos antárticos e não-antárticos não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Destacando-se apenas, que no encéfalo as defesas antioxidantes, quando normalizadas pela CS, são 4,5 vezes superiores ao obtido nos tecidos cardíacos (CROCKETT, 2011).

A LDH está envolvida na glicólise anaeróbica, possui localização citoplasmática e catalisa a redução do piruvato a lactato podendo, inclusive, converter o lactato a piruvato iniciando assim a gliconeogênese<sup>c</sup> (DEVLIN e MICHELACCI, 2003; NELSON e COX, 2008). O lactato provém da glicólise em diversos tecidos (músculo, sistema nervoso central e rim) e células (eritrócitos e leucócitos) e é captada da corrente sanguínea pelos hepatócitos. O acúmulo de precursores da gliconeogênese, no entanto, não afeta seu ritmo que é regulado através da modulação enzimática através de hormônios ou por respostas hepáticas auto-reguladoras devido à queda na glicemia (BERNE *et al.*, 2000).

Como primeira enzima do ciclo do ácido cítrico a citrato sintase possui localização na matriz mitocondrial e representa o potencial aeróbico gerador de ATP, catalisando a condensação do acetilcoenzima A (Acetil-CoA) e Oxaloacetato para formar o citrato, iniciando o ciclo de Krebs (STITT, 1984; NELSON e COX, 2008).

No metabolismo aeróbico, como enzima terminal do ciclo de Krebs, a enzima malato desidrogenase (MDH) catalisa a formação do oxaloacetato a partir do malato regenerando uma molécula de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) (NELSON e COX, 2008). Agindo na gliconeogênese, sob o produto da piruvato carboxilase, a MDH converte o oxaloacetato em malato, que é transportado para o citoplasma. A MDH citoplasmática oxida o malato a oxaloacetato que segue na gliconeogênese (MORGUNOV e SRERE, 1998; NELSON e COX, 2008). Desta maneira a MDH é um excelente indicador das taxas de respiração e metabolismo geral por estar envolvida em vias aeróbicas e gliconeogênicas de geração de energia.

---

<sup>c</sup> A gliconeogênese é a rota pela qual é produzida glicose a partir de compostos não aglicanos como aminoácidos, glicerol e lactato, com maior ocorrência no fígado, mas, também presente no rim (Berne *et al.*, 2000).

A hidrólise da glicose-6-fosfato é uma reação chave em ambas as vias metabólicas na gliconeogênese e na glicogenólise, que é a produção de glicose livre a partir do glicogênio hepático (HOCHACHKA, 1969). A glicose-6-fosfatase (G6Pase, EC 3.1.3.9), com ocorrência no rim, fígado e intestino (NELSON e COX, 2008) desempenha importante papel no controle metabólico, porém, ainda não foi estudada em peixes antárticos. É uma enzima transmembrana do retículo endoplasmático, dependente de  $Mg^{2+}$  e que age em caminho oposto a hexoquinase (HK), defosforilando a glicose-6-fosfato para formar glicose, utilizando para isso uma molécula de água. A glicose formada é utilizada pela célula e nos hepatócitos pode seguir para exportação sanguínea e regular a glicemia (NORDLIE *et al.*, 1999; VAN DE WERVE *et al.*, 2000; NELSON e COX, 2008).

De acordo com Metón *et al.* (2003) a expressão hepática da G6Pase em mamíferos é regulada pelo estado hormonal e nutricional. Longos períodos de jejum e hormônios que estimulam a expressão de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) levam ao aumento da G6Pase enquanto a realimentação e a administração de insulina diminuem sua expressão (ARGAUD *et al.*, 1996; MINASSIAN *et al.*, 1999)

Enquanto a G6Pase hepática pode levar ao aumento da glicemia a HK, por outro lado, é a enzima responsável por realizar a fosforilação da glicose captada via corrente sanguínea após a alimentação, provocando redução na glicemia (NORDLIE *et al.*, 1999). A glicoquinase (GK) é uma isoenzima hepato-específica da HK e possui elevada afinidade para a glicose, desta maneira a GK desempenha papel principal na exportação de glicose hepática (WEINHOUSE, 1976). Para evitar que a glicose recém formada no fígado, através da glicólise ou gliconeogênese torne-se produto da GK, ocorre nos hepatócitos a modulação negativa ou inibição da GK (NORDLIE *et al.*, 1999). Desta forma, a homeostase da glicemia é controlada pelo fígado a curto e longo prazo através da modulação da atividade e da expressão gênica das enzimas G6Pase e GK, controlando desta forma a taxa e o fluxo dos substratos glicose/ glicose-6-fosfato (NORDLIE *et al.*, 1999).

Diversos estudos têm mostrado que peixes carnívoros apresentam intolerância à glicose<sup>d</sup> e uso limitado de carboidratos na dieta (CHRISTIANSEN e KLUNGSOYR, 1987; BAANANTE *et al.*, 1991; WILSON, 1994) e comparados a mamíferos estes animais mostram hiperglicemia prolongada após dietas ricas em

---

<sup>d</sup> O termo intolerância a glicose é utilizado em humanos que após receberem administração de glicose a glicemia não retorna aos valores basais em um período inferior a 2 horas (Moon, 2001)

carboidratos (MOON, 2001). Contudo, Metón *et al.* (2004) demonstraram que peixes carnívoros possuem elevada capacidade de metabolizar carboidratos através do balanço adequado entre a expressão das enzimas GK e G6Pase hepáticas em peixes alimentados após longo período de jejum.

## 2.4 ESTADO REDOX DOS PEIXES ANTÁRTICOS

Peixes antárticos apresentam especial preferência na utilização de combustíveis na forma de ácidos graxos monoinsaturados (CROCKETT e SIDELL, 1990; SIDELL *et al.*, 1995; BRODTE *et al.*, 2008). Contudo, tanto o anabolismo quanto o catabolismo dessa classe de lipídeos gera consequências importantes no aumento do potencial oxidativo (CROCKETT, 2011). Além disso, a simples troca da preferência metabólica de glicose para lipídeos é capaz de ampliar o potencial do dano oxidativo devido à propensão em produzir peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), uma importante espécie reativa de oxigênio (ROS) (ST-PIERRE *et al.*, 2002).

Espécies reativas derivadas de oxigênio e nitrogênio podem gerar danos aos organismos vivos e são produzidas pela atividade metabólica normal ou devido a respostas a estímulos externos (OGUSUCU *et al.*, 2009). Por outro lado organismos aeróbicos apresentam inúmeros mecanismos de defesas contra espécies reativas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985). Entre estes, estão às chamadas peroxirredoxinas<sup>e</sup> que são capazes de detoxicar o peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos e peroxinitrito. Quando oxidados podem ser reciclados para seus equivalentes reduzidos através da tioredoxina e outros grupos tióis doadores de elétrons (HOFMANN *et al.*, 2002; WOOD *et al.*, 2003; RHEE *et al.*, 2005).

Além de agir sobre peróxidos, algumas peroxirredoxinas específicas podem atuar como chaperonas moleculares (MOON *et al.*, 2005; JANG *et al.*, 2008) e desempenhar importante papel na regulação de células afetadas por peróxido de hidrogênio (WOO *et al.*, 2003; WOOD *et al.*, 2003). A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) pertencente a esta família de proteínas e é uma importante enzima na defesa antioxidante, pois, catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (MCCORD e FRIDOVICH, 1969; KEELE *et al.*, 1971).

---

<sup>e</sup> Peroxirredoxinas compõem uma família de proteínas antioxidantes que possui uma cisteína no sítio ativo, utilizam o superóxido como aceptor de elétrons e grupos tióis como agentes redutores (Hofmann *et al.*, 2002).

A SOD é encontrada com elevado grau de conservação nos peixes antárticos (WITAS *et al.*, 1984; CASSINI *et al.*, 1993; SANTOVITO *et al.*, 2006) que possuem excepcional capacidade de metabolismo oxidativo possibilitado por um robusto sistema de defesas antioxidantes (CROCKETT e SIDELL, 1990; KAWALL *et al.*, 2002; CROCKETT, 2011).

## 2.5 EFEITOS DA VARIAÇÃO TÉRMICA

A variação térmica é uma pressão ambiental capaz de provocar estresse e, em determinados organismos, pode ser superada através da capacidade adaptativa ao promover ajustes comportamentais e fisiológicos (HOFFMANN e PARSONS, 1991; CRAWFORD *et al.*, 1999) através da expressão gênica na modulação da atividade enzimática de forma adequada (EDITH *et al.*, 1989; LUCCHIARI *et al.*, 1989; HARDEWIG *et al.*, 1999), na disponibilização de metabólicos em curto prazo, ou ainda, ao longo da escala temporal evolutiva, preservando vantagens moleculares adquiridas ao longo do tempo (HOCHACHKA e SOMERO, 1973; CLARKE, 1988; SOKOLOVA e PÖRTNER, 2003).

Segundo Somero e DeVries (1967) temperaturas acima de 5°C são letais aos peixes da família Nototheniidae e para avaliar a estenotermia dos peixes antárticos (VAN DIJK *et al.*, 1999; BRODTE *et al.*, 2008), estudos têm sido realizados com foco em sua fisiologia natural ou sob estresse térmico e/ou aclimação a temperaturas elevadas (CARPENTER e HOFMANN, 2000; LOWE e DAVISON, 2005). O peixe antártico *Trematomus bernacchii* sobreviveu em condições laboratoriais de 4°C durante 3 semanas (CARPENTER e HOFMANN, 2000), *Pagothenia borchgrevinki* durante 16 semanas (JIN e DEVRIES, 2006) e o *Pachycara brachycephalum* sobreviveu em 6°C durante 16 semanas (BRODTE *et al.*, 2008).

Em estudo comparativo entre o peixe antártico *P. brachycephalum*, da família Nototheniidae, e o *Zoarces viviparus*, um peixe de águas temperadas, ambas as espécies submetidas a diferentes temperaturas, verificou-se maiores teores de lipídeos na espécie antártica (BRODTE *et al.*, 2008), apesar de ambos os peixes



possuírem hábitos carnívoros<sup>f</sup>. Evidenciou-se também que o conteúdo lipídico e de triacilgliceróis diminuiu em temperaturas elevadas na espécie antártica. Utilizando as mesmas espécies, tempo e temperatura Brodte *et al.* (2006) observaram no tecido hepático de *P. brachycephalum* elevados níveis de proteína e redução significativa dos níveis de carboidratos em 4 e 6°C.

---

<sup>f</sup>Em organismos carnívoros a produção de energia ocorre de maneira prioritária através da degradação de aminoácidos ou do metabolismo de lipídeos (Brett e Groves, 1979).

### 3 OBJETIVO GERAL

Avaliar as respostas fisiológicas e metabólicas do peixe antártico *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) frente ao estresse térmico a altas temperaturas.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a concentração dos constituintes plasmáticos de *N. rossii* submetida a temperaturas elevadas.

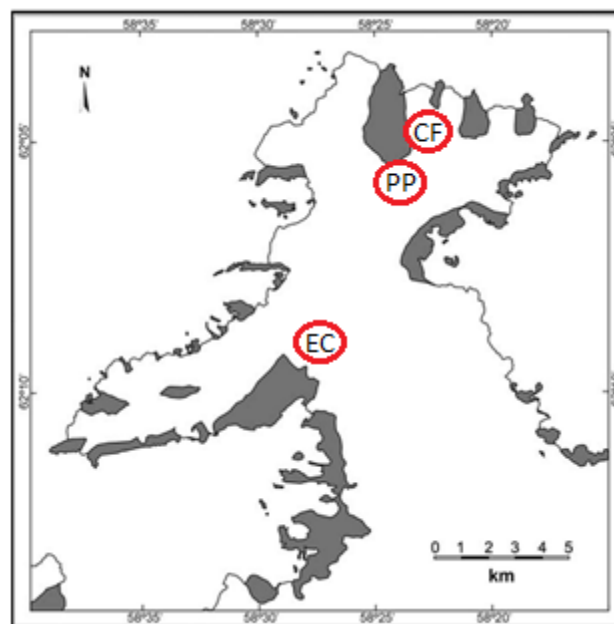
Determinar a composição dos substratos energéticos e dos índices de umidade, massa seca e minerais nos tecidos hepáticos e musculares de *N. rossii* frente ao aumento da temperatura;

Analisar a atividade de enzimas do metabolismo energético e estresse oxidativo de *N. rossii* frente às condições experimentais de temperaturas elevadas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO

Exemplares de *N. rossii* pesando entre 300 a 700 g foram coletados na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, nos pontos de coleta denominados de Punta Plaza (62° 05' 64,5" S; 58° 24' 31.7" W) e Glaciar Ecology (62°10',6 S; 058°26',5 W) no período de março a novembro dos anos de 2009 e 2010 (FIGURA 3). A profundidade de coleta variou entre 10 a 25 metros e a pesca com anzol e linha foi realizada com o auxílio de botes pneumáticos do tipo “Zodiac” ou a bordo da lancha oceanográfica “Skua” (FIGURA 4). Após a coleta os animais foram aclimatados em tanques de fibra de vidro (capacidade de 1000 l) na Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) durante 5 dias em salinidade de  $35 \pm 1,0$  psu, temperatura de  $0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro.



**Figura 3** – Mapa da Baía do Almirantado indicando os locais de coleta. Os espécimes de *Notothernia rossii* foram coletados em Punta Plaza (PP) e no Glaciar Ecology (EC). A EACF está representada no mapa como CF (62°05'0"S/ 58°23'28"W).

FONTE: Modificado de Simões *et al.* (2004).

A alimentação foi à base de músculo epaxial (localização dorsal superior) de peixes antárticos, oferecida a cada dois dias (48 horas) na quantidade

correspondente a 1% da massa corpórea. Animais que não se alimentaram durante 72 horas foram descartados e não seguiram para experimento.

A água do mar foi captada a uma profundidade de 4 metros, em frente à EACF, bombeada para os tanques e renovada 50% a cada 48 horas.



**Figura 4 – Meios de coleta.** Exemplos de *Notothenia rossii* foram capturados com o auxílio de (a) botes pneumáticos do tipo “zodiac” e da (b) lancha de apoio oceanográfico Skua.  
FONTE: (a) Beatriz Boucinhas e (b) Karin Elbers.

As licenças ambientais foram concedidas pelo Grupo de Assessoramento Ambiental (GAAM) do Ministério do Meio Ambiente (MMA) e o Código de Conduta do Comitê Científico sobre Pesquisa Antártica (Scientific Committee on Antarctic Research - SCAR) que trata do uso de animais para fins científicos na Antártica foi utilizado na manipulação e sacrifício dos animais. Esta pesquisa está registrada no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o nº 946.

## 4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados com no máximo 5 peixes/tanque (1 peixe/200 L), utilizando em média 10 peixes/experimento. As condições abióticas experimentais foram as mesmas da aclimação, isto é, salinidade de  $35 \pm 1,0$  psu e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. As temperaturas testadas foram de 0, 4 e 8°C. A temperatura da água nos tanques foi controlada através da utilização de termostatos Aquaterm 08 (Full Cauge). Quando a água atingia as temperaturas de 0, 4 ou 8°C, os animais foram transferidos para os tanques, não havendo uma aclimação progressiva, mas sim um choque térmico a temperatura previamente

definidas. Os animais foram mantidos nestas condições durante 24, 96, 360 e 720 horas (FIGURA 5).



**Figura 5 - Módulo de aquários da EACF.** Observar em (a) módulo climatizado contendo 6 tanques e (b) espécimes mantidos em condições experimentais.  
FONTE: (a) Autor desconhecido e (b) Edson Rodrigues Junior.

Após o término de cada experimento os animais foram anestesiados com benzocaína 1% ( $p v^{-1}$ ) e eutanasiados via secção medular, procedendo a retirada de amostras do fígado, músculo e plasma que foram congeladas em freezer  $-20^{\circ}C$ .

Para verificar se as condições de estresse geradas pelo confinamento dos animais em tanques não afetaram os resultados obtidos, utilizou-se um grupo controle. Esses animais, após permanecerem entre 18 a 24 horas nas mesmas condições abióticas da aclimatação, isto é, salinidade de  $35 \pm 1,0$  psu, temperatura de  $0 \pm 0,5^{\circ}C$  e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro, foram sacrificados e seguiram os diversos procedimentos analíticos. Os resultados obtidos neste grupo de peixes foram comparados exclusivamente com indivíduos submetidos a  $0^{\circ}C$ .

### 4.3 DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES PLASMÁTICOS

O sangue foi coletado mediante punção da veia caudal com seringa heparinizada. Para separar o plasma das células sanguíneas procedeu-se a centrifugação do sangue total à 3800g durante 10 minutos.

Glicose, proteínas totais, albumina, triglicerídeos, colesterol total, magnésio, cálcio, cloreto e hemoglobina foram determinados no plasma sanguíneo utilizando kits reagentes comerciais desenvolvidos pela Gold Analisa Diagnóstica Ltda. – Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

#### *4.3.1 Metabólitos não proteicos*

O colesterol total foi determinado enzimaticamente na presença de esterases e da colesterol oxidase. O peróxido de hidrogênio formado na reação de oxidação do colesterol foi quantificado na presença de fenol e 4-aminoantipirina, em reação catalisada pela peroxidase. O cromógeno formado na reação, a quinonimina, foi quantificado espectrofotometricamente em 500 nm.

A glicose plasmática foi convertida, através da glicose oxidase, em ácido pirônico e peróxido de oxigênio, que reage com a 4-aminoantipirina e fenol. A partir da reação catalisada pela peroxidase é então formado a quinoneimina determinada espectrofotômetro em comprimento de onda de 505 nm.

Os triacilgliceróis plasmáticos foram determinados através do método enzimático de Trinder. Na presença de lipases lipoproteicas a porção éster do glicerol presentes nas lipoproteínas plasmáticas foi hidrolisada liberando glicerol. Após a fosforilação do glicerol em glicerol-3-fosfato, pela gliceroquinase, o mesmo foi oxidado pela glicerol-3-fosfato oxidase gerando água oxigenada, que na presença de 4-aminoantipirina e 4-clorofenol originou o cromóforo quinoneimina. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em comprimento de onda de 505 nm.

#### 4.3.2 Eletrólitos não proteicos

O magnésio plasmático foi determinado espectrofotometricamente pelo método do magon sulfonado em comprimento de onda de 505 nm.

Para determinar o cálcio plasmático utilizou-se o método da cresolftaleína complexona em meio alcalino, utilizando 8-hidroxiquinoleína para evitar a interferência do magnésio. O complexo formado foi quantificado fotometricamente em comprimento de onda de 570 nm.

O cloreto plasmático foi determinado pelo método do tiocianato de mercúrio, no qual o tiocianato liberado na reação reage com íons férricos, originando tiocianato férrico de coloração amarelada, que absorve luz em 470 nm. A concentração de cloreto plasmático no tempo 360 h do experimento 8°C não foi determinada por insuficiência de material biológico.

#### 4.3.3 Metabólitos proteicos

O conteúdo proteico total do plasma foi determinado pelo método de Biureto em comprimento de onda de 545 nm. A fração albumínica foi quantificada pelo método do verde de bromocresol em comprimento de onda de 630 nm.

Para determinar o conteúdo de hemoglobina, o grupo heme foi oxidado ao estado férrico pelo ferricianeto formando a hemiglobina, que se combina com cianeto ionizado e forma cianeto de hemiglobina, um composto estável que é quantificado espectrofotometricamente em 540 nm.

### 4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS SUBSTRATOS ENERGÉTICOS TECIDUAIS

#### 4.4.1 Glicogênio total

Empregando-se o método de Dubois *et al.* (1956), modificado por Bidinoto *et al.* (1997), realizou-se a análise da concentração tecidual de glicogênio hepático e muscular. O método inicia-se pela obtenção do homogeneizado de 0,1 g do tecido

em 1 ml de KOH 6 M, sendo este mantido durante 5 minutos em banho Maria aquecido a 100°C. 250 µl desta solução foi transferida para tubo de ensaio, que recebeu 3 ml de etanol e 100 µl de sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ) seguida de agitação no vórtex. O homogeneizado foi centrifugado a 3000g por 3 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado re-suspenso em 2,5 ml de água destilada. Para determinar o glicogênio nos tecidos hepáticos foi adicionado 50 µl da solução re-suspensa em 450 µl de água destilada, 500 µl de fenol (4,1% diluído em água) e 2 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ). Homogeneizados do músculo não necessitaram de adição de água sendo utilizados 500 µl da solução re-suspensa, 500µl de fenol (4,1% diluído em água) e 2 ml de  $H_2SO_4$ . A leitura foi realizada em 480 nm. Os valores foram expressos em unidades de glicosil-glicose por grama de tecido utilizando-se como referência um padrão de 100 nM de glicose.

#### 4.4.2 Proteínas totais

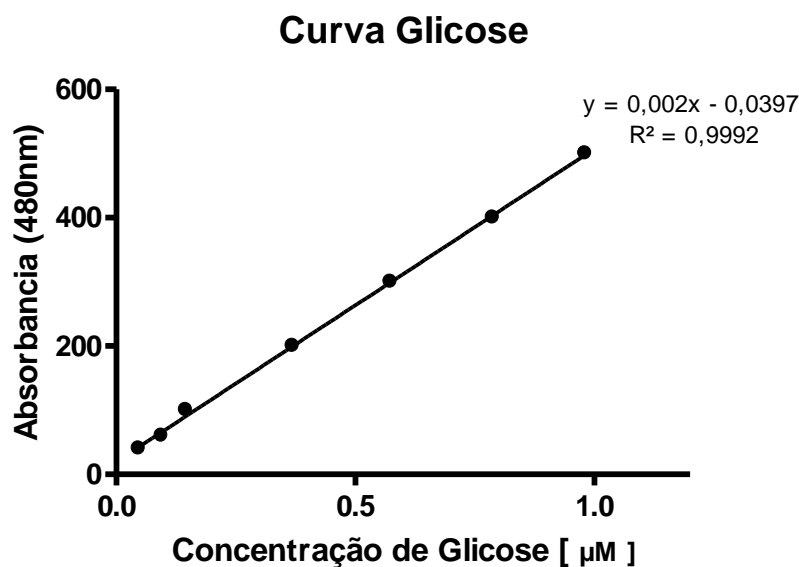
Pelo método de Lowry *et al.* (1951) o conteúdo de proteínas teciduais totais foi determinado, utilizando-se albumina bovina sérica como padrão. O método inicia-se com a obtenção do homogeneizado de 0,1 g do tecido em 1 ml de hidróxido de sódio 6 M deixado durante 5 minutos em banho Maria a 100°C. Após esfriar em temperatura ambiente o homogeneizado foi mantido a 4°C. A seguir adicionou-se 400 µl do homogeneizado em 5 ml de Reagente de Lowry, sendo a solução agitada no vórtex e incubada por 30 minutos, evitando-se a exposição à luz direta. Em seguida acrescentou-se 500 µl de Folin-Ciocalteu, reagente de fenol diluído 50% em água destilada. A seguir a amostra foi incubada durante 15 minutos, protegido da luz direta. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 660 nm.

Para se obter o Reagente de Lowry é necessário misturar, na proporção de 100:1:1, as soluções A, B e C as quais são compostas de: solução A: 2g de hidróxido de sódio, 10g de carbonato de sódio em 500ml de água destilada, solução B: 1g de sulfato de cobre em 50 ml de água destilada e a solução C: 2g de tartarato duplo de sódio e potássio em 50 ml de água destilada.



#### 4.4.3 Curvas de referências para determinações de glicogênio

Para determinar o conteúdo de glicogênio em tecidos hepáticos e musculares utilizou-se o método de Dubois *et al.* (1956), modificado por Bidinoto *et al.* (1997) através da homogeneização do tecido em KOH em aquecimento de 100°C e precipitação com o emprego de Etanol e sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ). O cromógeno da reação foi produzido através do uso de fenol e ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) com a leitura realizada em 480 nm. Os valores foram expressos em unidades de glicosil-glicose por grama de tecido utilizando-se como referência um padrão de 100  $\mu M$  de glicose com leitura realizada juntamente com as amostras. Para validação do método foi produzida uma curva de referência com diferentes concentrações de glicose (FIGURA 6).



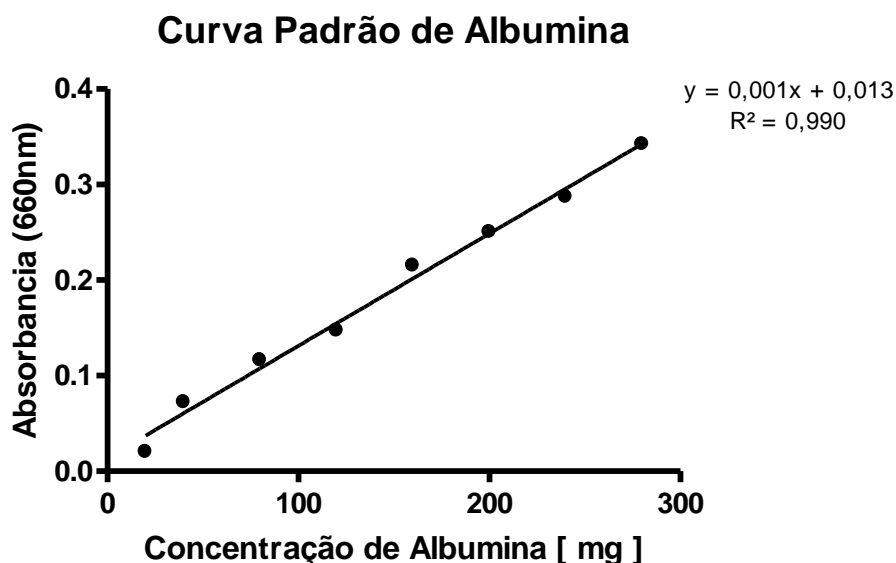
**Figura 6** – Curva de referência obtida a partir de diferentes concentrações de glicose, com leitura em 480 nm.

FONTE: O autor (2012).

#### 4.4.3 Curvas de referências para determinações de proteínas totais

Através do método de Lowry *et al.* (1951) foram determinadas as proteínas totais em tecidos hepáticos e musculares e o padrão utilizado como referência foi uma curva com diferentes concentrações de albumina bovina sérica como padrão (FIGURA 7). A cor produzida na reação foi determinada espectrofotometricamente

em 660 nm e foi obtida ao se adicionar o Reagente de Lowry e Folin-Ciocalteu, reagente de fenol.



**Figura 7** – Curva de referência obtida a partir de diferentes concentrações de albumina bovina sérica, com leitura em 660nm.  
FONTE: O autor (2012).

#### 4.4.3 Lipídeos Totais

Os lipídeos totais foram estimados gravimetricamente após extração com clorofórmio-metanol, de acordo com Folch *et al.* (1957) e iniciou-se com a obtenção do homogeneizado de 0,1 g de tecido em 1 ml da solução clorofórmio:metanol (2:1) com o emprego de um homogeneizador mecânico manual *Tissue Ruptor Qiagen*.

Em uma proveta de 10 ml foi transferido o homogeneizado sendo o volume completado com a solução clorofórmio:metanol. A proveta foi mantida fechada em 4°C e transcorridas 6 horas a amostra foi filtrada, em filtro milipore com diâmetro de 0,22 µm, para outra proveta de 10ml e foi adicionado 1 ml de solução salina (NaCl 0,9%) para cada 5 ml de amostra. Mais uma vez a proveta foi tampada e mantida em refrigeração de 4°C.

Transcorrido 6 horas a solução se separou em duas fases, a superior (fase aquosa) foi descartada e a inferior (fase clorofórmica) transferida para uma placa de petri previamente pesada e identificada. Esta foi mantida sobre capela de 12 a 24 horas para evaporação e, após este período, a placa foi novamente pesada. O conteúdo lipídico é conhecido ao se subtrair o peso obtido do peso inicial da placa. Os valores estão expressos em percentagem de lipídeo na amostra.

#### *4.4.4 Determinação de massa seca e umidade*

A percentagem de massa seca (MS%) foi determinada após manter a amostra a 105°C durante 24h. Ao subtrair o peso obtido após a estufa do peso anterior ao aquecimento e expressando-se em percentagem obtêm-se a MS% da amostra. Realizando procedimento semelhante, porém, apenas com a diferença entre ambos os pesos foi obtida umidade (U%).

#### *4.5.1 Determinação de minerais*

Após o processo descrito no item anterior as amostras foram levadas para placas aquecedoras onde receberam 1 gota de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$  – densidade: 1.413 g/mL em 25 °C, 25%), para acelerar a liberação do carbono, e permaneceram até a evaporação da matéria oxigenada. A amostra seguiu para mufla aquecida entre 500 e 550°C permanecendo durante 2h. O peso das cinzas, obtido após o emprego da mufla, representa a quantidade de minerais na amostra e foi expresso em percentagem.

### 4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As leituras espectrofotométricas para determinação enzimática foram realizadas em duplicata no leitor de microplacas FLUOstar Optima (BMG Labtech) do Laboratório de Bioquímica da Universidade de Taubaté (UNITAU). Para normalizar o conteúdo enzimático observado em cada amostra, determinamos o conteúdo de proteínas totais nos homogeneizados através do método do ácido bicintronínico (BCA), utilizando o Kit reagente QuantiPro BCA da Sigma-Aldrich.

#### *4.5.1 Obtenção do homogeneizado*

Amostras de músculo e fígado foram homogeneizados a 20% ( $\text{p v}^{-1}$ ) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) com o emprego de um homogeneizador motorizado

Potter-Elvehjem com copo de vidro e pilão de teflon. O homogeneizado foi sonificado durante 15 segundos para ruptura de estrutura subcelulares, como retículo endoplasmático e mitocôndria. A seguir o homogeneizado foi centrifugado em 14.000g a 4°C durante 10 min e o sobrenadante foi utilizado para as determinações da atividade enzimática.

#### *4.5.2 Determinação da atividade da MDH*

A atividade da MDH hepática e muscular foi determinada segundo o método descrito por Childress e Somero (1979). O sistema de reação foi composto de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), oxaloacetato 0,4 mM, cloreto de magnésio 20 mM, NADH 0,155 mM. O início da reação ocorreu com a adição do sistema de reação. O método foi adaptado para um volume final de 80  $\mu$ L utilizando microplacas de 384 poços. A reação foi acompanhada em 340 nm considerando o coeficiente de extinção do NADH  $\epsilon_{340} = 5,343 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$ . A leitura ocorreu em ciclos de 21s. Uma unidade internacional de enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de converter 1  $\mu$ mol de NADH em  $\text{NAD}^+$  no tempo de 1 minuto, resultando na redução da absorbância. A atividade foi expressa em Unidade internacional de enzima (U) normalizada pela concentração de proteínas ( $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína). A NAD em sua forma reduzida (NADH) absorve luz, por outro lado, quando oxidada ( $\text{NAD}^+$ ) não possui absorbância. A atividade da MDH e da LDH presente no extrato protéico provoca a oxidação da NADH no sistema de reação, provocando uma redução da absorbância ao longo do tempo analisado.

#### *4.5.3 Determinação da atividade da CS*

A atividade hepática da CS foi determinada segundo o método descrito por Saborowski e Buchholz (2002). O sistema de reação foi composto de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), cloreto de potássio 100mM, EDTA 1 mM, 5,5'- Ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,2 mM, acetil Coenzima A 0,2 mM e oxaloacetato 0,5 mM. Uma tomada de ensaio de 5  $\mu$ L de amostra homogeneizado foi previamente incubada com 70  $\mu$ L do sistema de reação por 10 minutos. A reação teve o seu início com a adição de 5  $\mu$ L de oxaloacetato 8 mM, correspondente a concentração

final de 0,5 mM no sistema de reação. A atividade da CS foi quantificada espectrofotometricamente através da cinética enzimática onde foram realizadas leituras cíclicas de 21s em comprimento de onda de 410 nm. Para tanto, considerou-se o coeficiente de extinção do DTNB de  $\epsilon_{410}$  25,01 mM . cm<sup>-1</sup>. Na reação verificou-se o aumento na absorbância devido à interação entre DTNB e a sulfidrila da Coenzima A reduzida pela ação da CS. Uma unidade internacional de enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de converter 1  $\mu$ mol de Coenzima A em oxaloacetato no tempo de 1 minuto. A atividade foi expressa em U . mg<sup>-1</sup>.

#### 4.5.4 Determinação da atividade da LDH

A atividade da LDH hepática e muscular foi determinada segundo o método Thuesen *et al.* (2005). O sistema de reação foi composto de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), piruvato de sódio 1 mM, cloreto de potássio 100 mM,  $\beta$ -Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido ( $\beta$ -*Nicotinamide adenine dinucleotide reduced* - NADH) 0,254 mM. A reação teve o seu início pela adição de 10  $\mu$ L do homogeneizado ao sistema de reação, para um volume final de 80  $\mu$ L. A reação foi acompanhada em 340 nm considerando o coeficiente de extinção do NADH  $\epsilon_{340}$  = 5,343 mM . cm<sup>-1</sup>. A leitura ocorreu em ciclos de 21s, analisando a queda na absorbância devido à oxidação do NADH para NAD<sup>+</sup>. Uma unidade internacional de enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de converter 1  $\mu$ mol de NADH em NAD<sup>+</sup> no tempo de 1 minuto, resultando na redução da absorbância. A atividade foi expressa U . mg<sup>-1</sup>.

#### 4.5.5 Determinação da atividade da SOD

A atividade da SOD foi determinada seguindo o método de Crouch *et al.* (1981), adaptado para um volume final da reação de 200  $\mu$ L utilizando microplacas de 96 poços. A redução do NBT foi acompanhada espectrofotometricamente em 560 nm, com ciclos de leitura de 21s. O sistema de reação utilizado continha tampão carbonato de sódio 100 mM (pH 10,2), EDTA 0,017 mM, cloreto de azul de nitrotetrazólio (*Nitro Blue Tetrazolium*, NBT) 1 mM e hidroxilamina 37 mM. Em meio alcalino a hidroxilamina atua como um gerador de íon superóxido, que é capaz de reduzir o NBT presente no sistema de reação. A atividade da SOD oriunda do

homogeneizado tecidual inibe a redução do NBT. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a redução do NBT para azul de formazan, no tempo de 1 minuto e expressa como  $U \cdot mg^{-1}$ . A redução do NBT na ausência de SOD foi levada a efeito em 143  $\mu L$  do sistema de reação (tampão carbonato, EDTA e NBT), 37  $\mu L$  de hidroxilamina 200 mM e 20  $\mu L$  de água ultrapura. Em cada determinação foram empregadas duas estratégias diferentes para a determinação da SOD. 1. A redução do NBT na presença do homogeneizado foi levada a efeito em 143  $\mu L$  do sistema de reação, 37  $\mu L$  de hidroxilamina 200 mM, 10  $\mu L$  de homogeneizado e 10  $\mu L$  de água ultrapura. 2. O efeito provocado pelo superóxido endógeno foi verificado em 10  $\mu L$  de amostra, 143  $\mu L$  do mesmo sistema de reação e 47  $\mu L$  de água ultrapura. Em ambas as situações a hidroxilamina deu início na reação. A atividade da SOD do homogeneizado tecidual foi determinada subtraindo-se a atividade obtida na estratégia 2, a qual demonstra o efeito do superóxido endógeno.

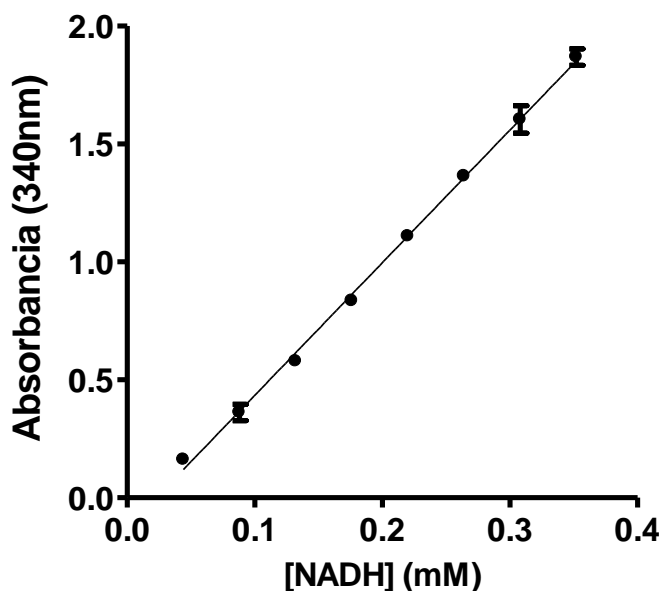
#### 4.5.6 Determinação da atividade da G6Pase

A atividade da G6Pase hepática foi determinada pelo método descontínuo descrito por Fathi *et al.* (2002). O sistema de reação foi composto por tampão Imidazol 100 mM (pH 7,4), ácido etileno diamino tetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid* – EDTA) 1,8 mM, glicose-6-fosfato 26,5 mM. A reação teve início com a adição de 20  $\mu L$  de homogeneizado ao sistema de reação para volume final de 40  $\mu L$ . O tempo de reação foi de 60 min em temperatura de 20°C. A reação foi interrompida ao adicionar 200  $\mu L$  de reativo verde de malachita (um volume de molibdato de amônia 4,2% ( $p v^{-1}$ ) para três volumes de verde de malachita 0,045% ( $p v^{-1}$ ) e Tween 20 1% ( $p v^{-1}$ )). O fosfato inorgânico formado na reação foi quantificado em comprimento de onda de 600 nm. A quantidade de fosfato inorgânico formado foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do fosfato inorgânico  $\epsilon = 5,386 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Uma unidade internacional foi considerada como o montante de enzima capaz de converter 1  $\mu\text{mol}$  glicose-6-fosfato em glicose, liberando fosfato inorgânico, no tempo de 1 minuto. Os resultados foram expressos em  $U \cdot mg^{-1}$ .

#### 4.5.7 Curvas de referências para as determinações enzimáticas

A determinação de quatro das cinco enzimas analisadas dependeu da obtenção do coeficiente de extinção do composto que absorve luz. Para obter o coeficiente de extinção foi necessária a construção de uma curva padrão de referência do composto analisado. Esta estratégia foi empregada para a NADH, a Acetil-CoA e para o fosfato inorgânico.

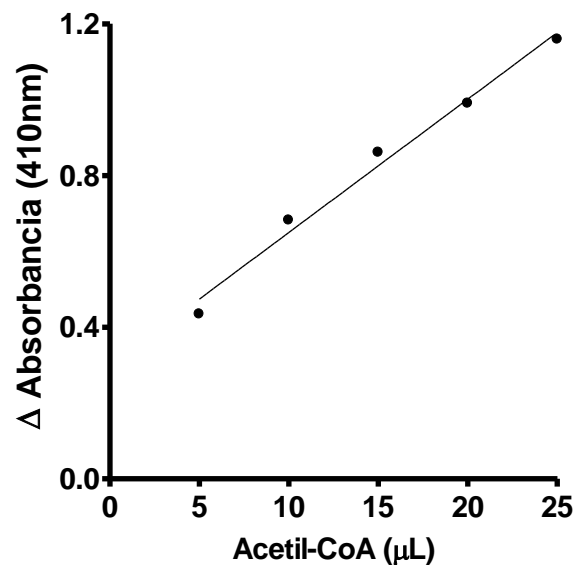
A construção da curva de referencia do NADH foi realizada a partir de diferentes concentrações do analito analisado em leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 340 nm em ciclos de 21s. O coeficiente de extinção obtido foi de  $\epsilon_{340} = 5,343 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$  (FIGURA 8).



**Figura 8** – Curva de referência obtida com diferentes concentrações de NADH através de leitura em 340 nm.

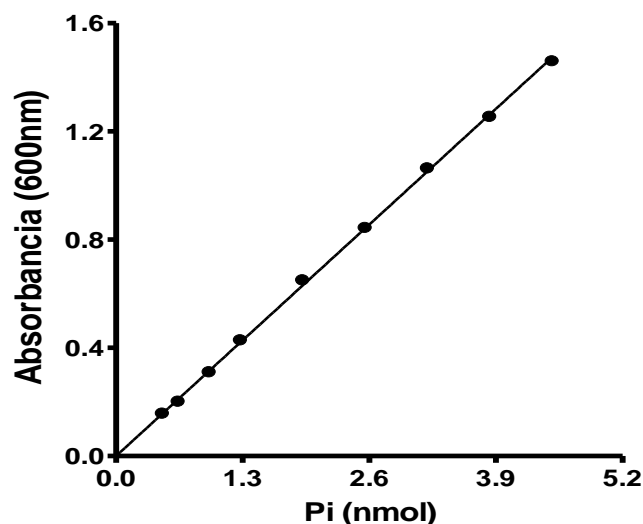
FONTE: O autor (2012).

Por motivos metodológicos a curva de referência para a CS foi obtida através de diferentes volumes do homogeneizado de tecidos renais do peixe *Notothenia rossii*, obtendo, desta forma, diferentes concentrações da enzima CS. A leitura foi realizada durante 4 horas até o esgotamento do substrato presente no sistema de reação. Obteve-se  $\epsilon_{410}$  de  $25,01 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e  $R^2$  de 0,9863, o valor da inclinação da reta foi  $P 0,0007$  (FIGURA 9).



**Figura 9** – Curva de referência produzida a partir de diferentes volumes de homogeneizado de tecidos renais do peixe *Notothenia rossii*, para obter diferentes concentrações da enzima citrato sintase, a reação foi acompanhada até o fim do substrato do sistema de reação durante 4 horas. A leitura foi realizada em 410 nm.  
 FONTE: O autor (2012).

Para determinar a atividade da enzima G6Pase utilizou-se o método de ponto final (FATHI *et al.*, 2002) e uma curva de referência com diferentes concentrações de fosfato inorgânico com leitura em 600 nm (FIGURA 10). O coeficiente de extinção obtido foi  $5,386 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$  com  $R^2 = 0,9978$  e a variação na absorbância apresentou P menor que 0,0001.



**Figura 10** – Curva de referência produzida a partir de diferentes concentrações de fosfato inorgânico onde o cromógeno foi quantificado espectrofotometricamente em 600 nm.  
 FONTE: O autor (2012);



#### 4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP (desvio padrão). O teste ANOVA monofatorial, seguido do pós-teste de Tukey foi utilizado para comparar as diferenças entre as médias. Para comparar as médias das atividades enzimáticas envolvendo o efeito dos fatores tempo e temperatura, foi utilizado o teste ANOVA bifatorial (duas vias). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas para  $P < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Não foi observado morte de *N. rossii* nas três temperaturas e nos tempos de exposição testados.

### 5.1 CONSTITUINTES PLASMÁTICOS

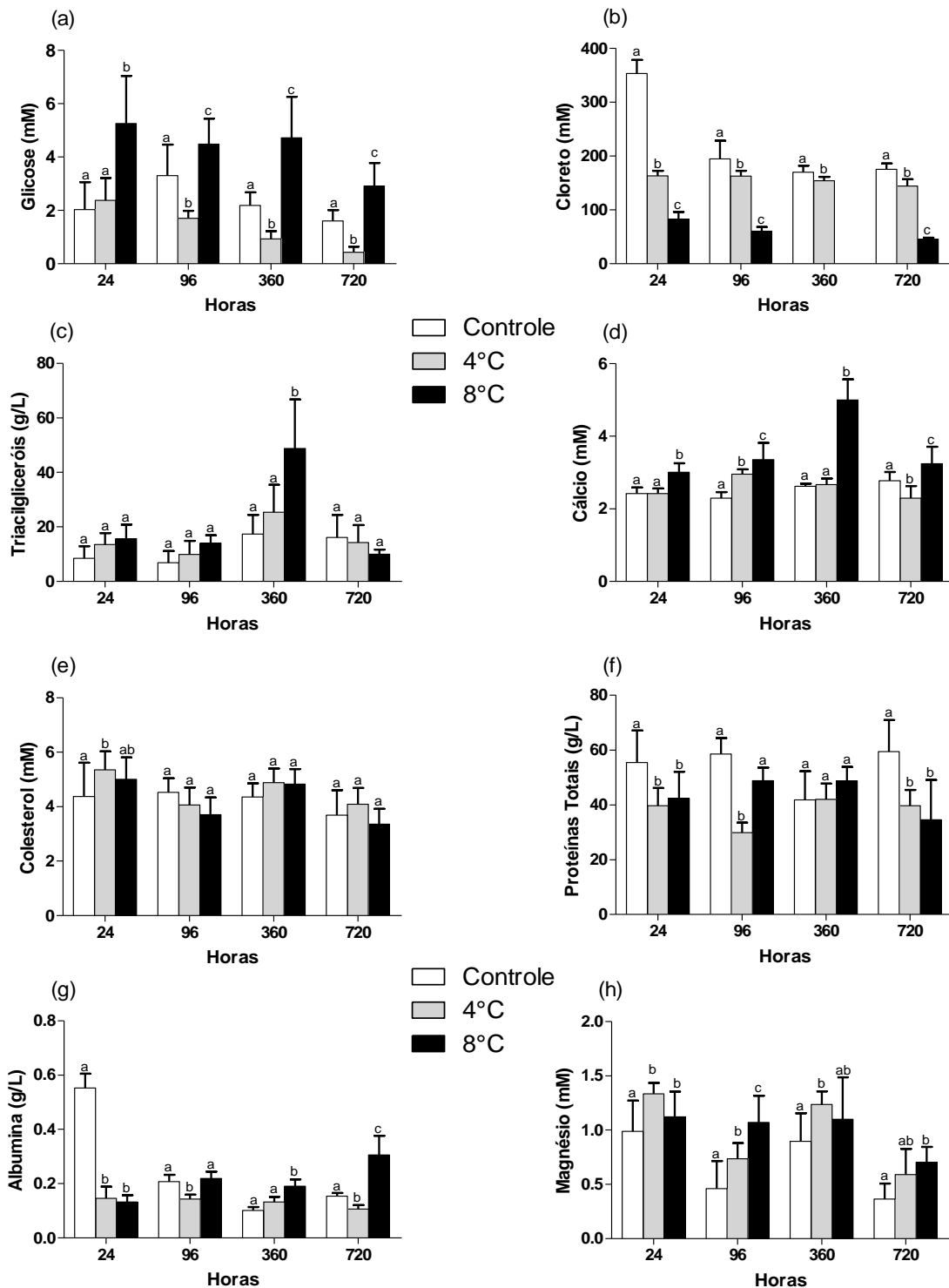
Na temperatura de 4°C verifica-se a redução da glicemia nos tempos 96, 360 e 720 horas de aclimação em relação ao controle. No aquecimento a 8°C o índice glicêmico foi superior ao obtido no controle e na temperatura 4°C, apresentando redução gradual entre os tempos de aclimação (FIGURA 11a). Em 4°C após 720h (30 dias) de aclimação encontramos a menor concentração glicêmica, deste estudo, sendo  $0,4 \pm 0,21$  mM ( $n = 10$ ), no mesmo período a glicemia no controle foi  $1,6 \pm 0,42$  mM ( $n = 10$ ) e em 8°C  $3,2 \pm 0,47$  mM ( $n = 9$ ).

O grupo de peixes submetido a 0°C durante 24 horas ( $n = 10$ ) apresentou os maiores índices de cloreto plasmático deste estudo, no entanto, nos demais tempos na mesma temperatura a concentração de cloreto não apresentou diferenças estatísticas entre si. Na temperatura de 4°C, os índices de cloreto no plasma dos peixes declinaram ao longo dos tempos de aclimação, no entanto, diferenças estatísticas foram observadas apenas em relação aos peixes submetidos as demais temperaturas (FIGURA 11b). Na temperatura de 8°C, em todos os tempos analisados, o cloreto plasmático encontrou-se reduzido em relação ao controle e também em relação a 4°C.

A concentração plasmática de triacilgliceróis verificada na *N. rossii* foi significativamente elevada em 8°C apenas em 360h ( $48,8 \pm 17,99$  g/L –  $n = 10$ ) em relação as temperaturas 0°C ( $17,4 \pm 7,02$  g/L –  $n = 7$ ) e 4°C ( $25,4 \pm 10,07$  g/L –  $n = 10$ ) (FIGURA 11c). Nas demais situações não verificamos diferenças significativas nesta análise.

Na temperatura 4°C no tempo 96h ( $n = 10$ ) verificamos um aumento de 29% do índice de cálcio no plasma em relação à temperatura 0°C ( $n = 9$ ), por outro lado, em 720h ( $n = 10$ ) na mesma temperatura essa concentração foi 17% inferior ao controle ( $n = 10$ ) (FIGURA 11d). O aquecimento para 8°C desencadeou um aumento

crecente de cálcio no plasma da *N. rossii* até o tempo experimental de 360h (n = 10). Contudo, na aclimação de 1 mês (720h) (n = 9), os níveis de cálcio plasmático permaneceram no mesmo patamar observado em 96h nesta temperatura.



**Figura 11** – Variações dos constituintes plasmáticos do peixe antártico *Notothenia rossii* submetido ao estresse térmico. Os valores representam a média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação aos valores do controle e entre 4°C e 8°C (Teste de Bonferroni - P < 0,05).  
 FONTE: O autor (2012).

Verificamos variação do colesterol plasmático apenas em 4°C após 24h de aclimação (n = 10) cuja concentração foi 22% superior ao observado em 0°C (n = 10) (FIGURA 11e). O grupo submetido ao mesmo tempo, porém, a 8°C não apresentou diferenças estatísticas na concentração de colesterol quando comparado ao observado em 0 e 4°C.

Na temperatura de 4°C os níveis proteicos no plasma da *N. rossii* foram reduzidos em relação aos respectivos controles, com exceção do tempo 360h (FIGURA 11f). Na temperatura 8°C concentrações inferiores ao controle foram observadas nos tempos de 24h (24%) e 720h (42%).

Semelhante ao observado no índice de cloreto plasmático o grupo de peixes submetido a 0°C durante 24h expressou os maiores níveis de albumina plasmática deste estudo, no entanto, nos demais tempos da mesma temperatura não verificamos diferenças estatísticas entre si (FIGURA 11g). Peixes submetidos a 4°C apresentaram redução gradual dos níveis de albumina em função do tempo, exceto no tempo 360h. Comportamento inverso foi observado em relação ao aquecimento em 8°C, com elevadas concentrações desta proteína em 720h, em relação a 0 e 4°C.

Os níveis de magnésio plasmático dos peixes submetidos a 4 e 8°C, com exceção ao observado nos tempos 360h (8°C) e 720h (4°C) foram superiores ao observados em 0°C (FIGURA 11h).

O teste ANOVA bifatorial evidenciou efeito significativo do tempo, da temperatura e interação entre ambos os fatores sobre os constituintes plasmáticos analisados, exceção feita apenas para proteínas plasmáticas onde ocorreu apenas o efeito da temperatura e interação entre os dois fatores (TABELA 1).

## 5.2 HEMOGLOBINA

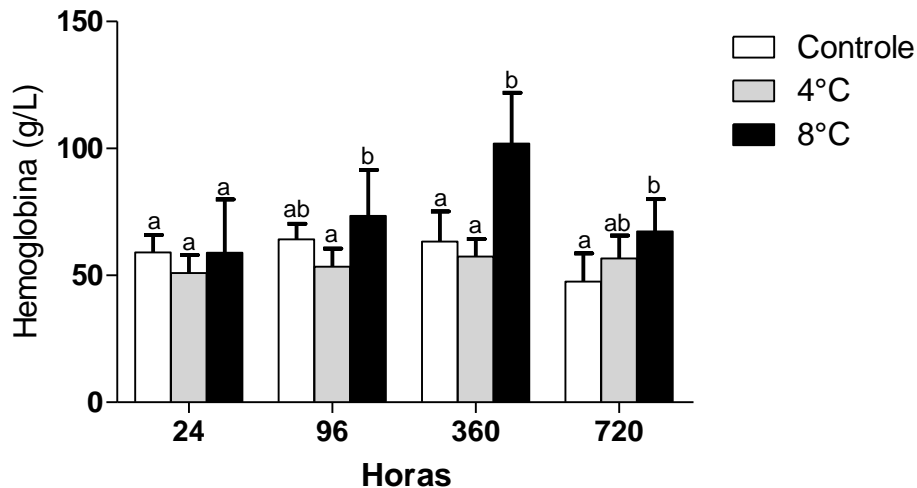
O efeito do tempo, da temperatura e da interação entre ambos os fatores foi significativos sobre o conteúdo de hemoglobina (ANOVA bifatorial). A concentração desta proteína no sangue dos peixes apresentou variações significativas apenas na temperatura de 8°C (FIGURA 12). Nesta temperatura após 96h (n = 10) o conteúdo de hemoglobina foi 37% superior ao observado em 4°C (n = 10). Em 360h (n = 4) foi

61% superior ao controle (n = 7) e 77% superior em relação a 4°C (n = 10). Contudo, a hemoglobina dos peixes mantidos durante 720h em 8°C retornou aos valores observados em 4 dias de aclimação (96 horas). Nas temperaturas de 0 e 4°C não verificamos diferenças estatísticas.

**Tabela 1** - Resultados do teste ANOVA bifatorial para o efeito do tempo, da temperatura e interação entre ambos os fatores sobre constituintes plasmáticos da *Notothenia rossii* submetida ao estresse térmico (\* P < 0,05 – ns = não significativo).

FONTE: O autor (2012).

Variáveis	Tempo	Temperatura	Interação
Glicemia	*	*	*
Hemoglobina	*	*	*
Trigliceridemia	*	*	*
Proteínas Plasmáticas Totais	ns	*	*
Albumina	*	*	*
Calcemia	*	*	*
Cloremia	*	*	*
Colesterolemia	*	*	*
Magnesemia	*	*	*



**Figura 12** - Variação da hemoglobina do peixe antártico *Notothenia rossii* submetido ao estresse térmico. Os valores representam a média ± DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação aos valores do controle e entre 4°C e 8°C (Teste de Bonferroni - P < 0,05).

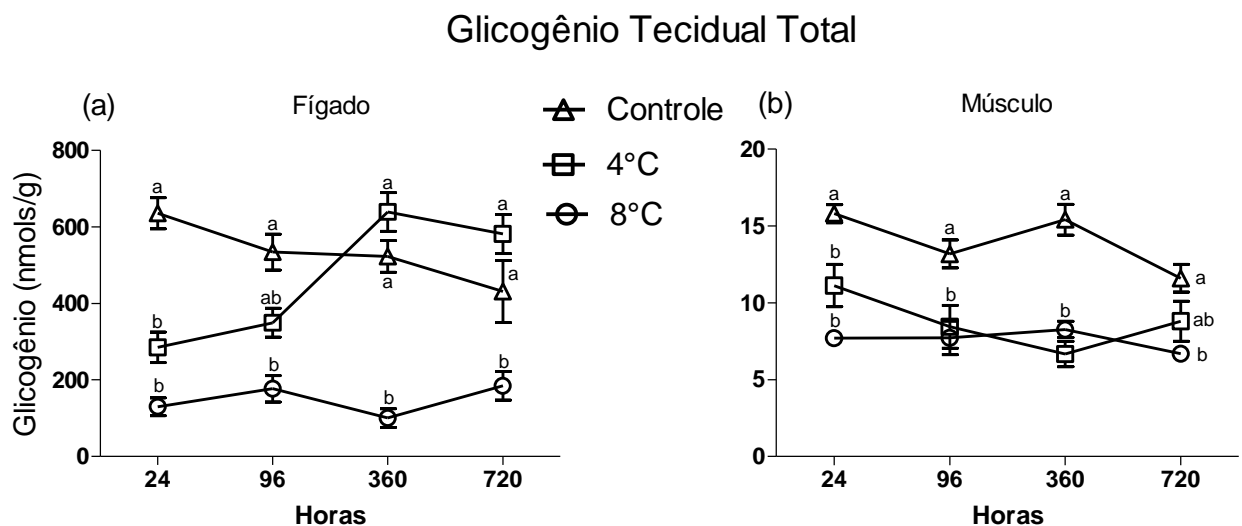
FONTE: O autor (2012).

### 5.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA TECIDUAL

#### 5.3.1 Glicogênio

Verificamos respostas fisiológicas nos níveis hepáticos e musculares de glicogênio em grupos de peixes submetidos as temperaturas elevadas. Quando submetido a 4°C a concentração de glicogênio hepático em 24h (n = 10) foi 55% inferior ao observado em 0°C (n = 7), porém nos demais tempos observamos regulação positiva deste índice e as variações em relação ao controle não foram significativas (FIGURA 13). Por outro lado, o glicogênio muscular nesta temperatura foi inferior aos respectivos controles nos tempos 24, 96 e 360h, com regulação positiva em 720h. O aquecimento a 8°C levou a concentração reduzida de glicogênio muscular e hepático em todos os tempos analisados, em relação à temperatura 0°C. Diferente do fígado, não foram observadas diferenças entre o glicogênio muscular dos peixes aclimatados nas temperaturas de 4°C quando comparados ao submetidos a 8°C.

No fígado o conteúdo de glicogênio foi afetado pela temperatura e pela interação entre tempo e temperatura. Por outro lado, no músculo verificamos efeito apenas do tempo e da temperatura sobre a concentração de glicogênio (ANOVA bifatorial).

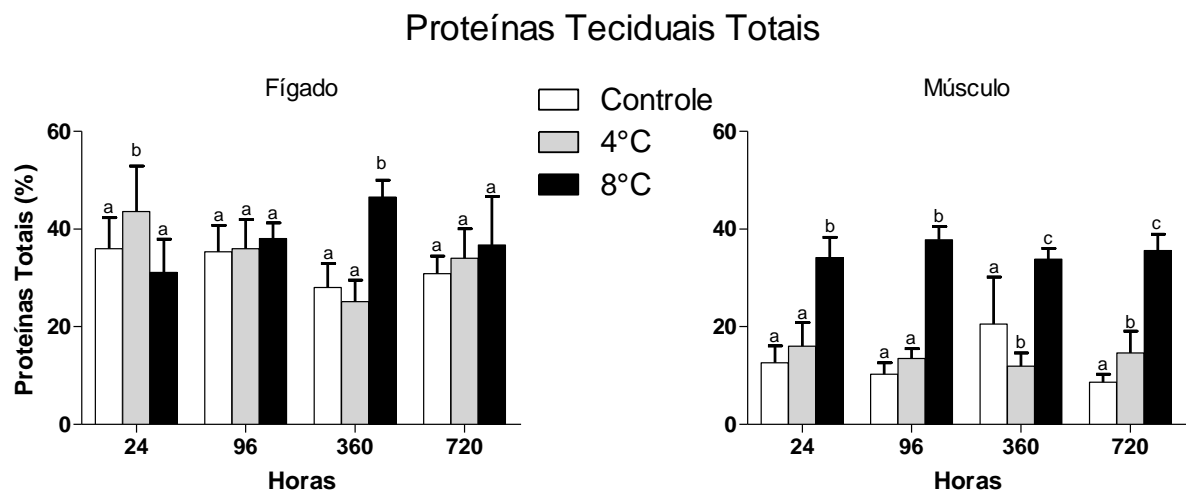


**Figura 13** - Conteúdo de glicogênio hepático e muscular do peixe antártico *Notothenia rossii* submetido ao estresse térmico. Os valores representam a média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação aos valores do controle e entre 4°C e 8°C (Teste de Bonferroni -  $P < 0,05$ ).

FONTE: O autor (2012).

### 5.3.2 Proteínas

O conteúdo proteico no fígado, no tempo 24h, foi 23% superior em 4°C (n = 10) em relação ao controle (n = 9) e 40% em relação a 8°C (FIGURA 14). Por outro lado, na temperatura 8°C verificamos que em 360h (15 dias) o conteúdo proteico do fígado ultrapassou 50% (n = 5) do conteúdo encontrado em 0°C (n = 7) e 85% em relação à temperatura 4°C (n = 10).



**Figura 14** - Conteúdo proteico do fígado e músculo do peixe antártico *Notothenia rossii* submetido ao estresse térmico. Os valores representam a média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação aos valores do controle e entre 4°C e 8°C (Teste de Bonferroni -  $P < 0,05$ ).  
 FONTE: O autor (2012).

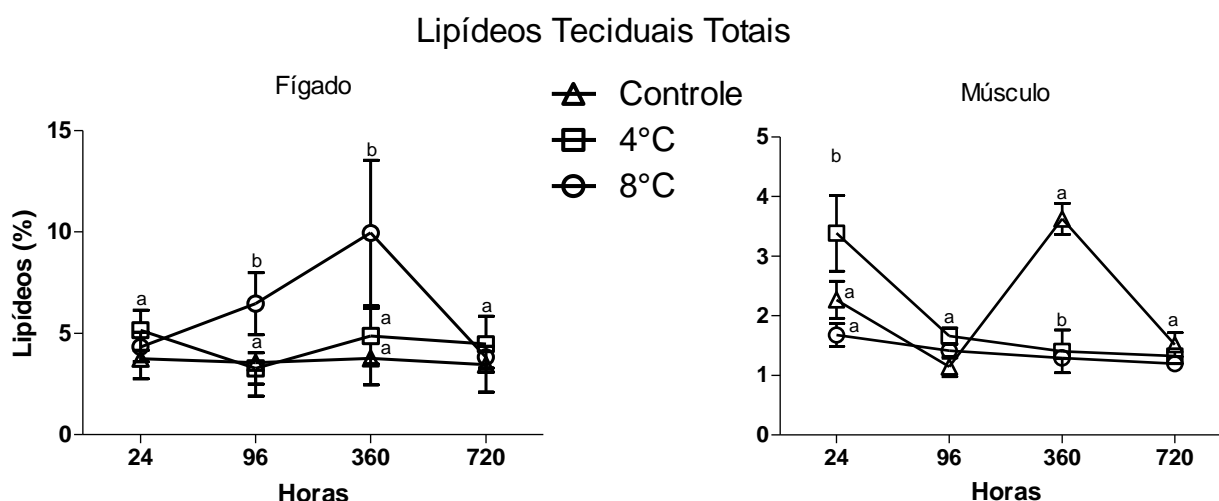
Nos tecidos musculares em 4°C a concentração proteica no tempo 360h foi 42% reduzida (n = 9) em relação a 0°C (FIGURA 14). No tempo de 30 dias (720h) o conteúdo proteico muscular obtido em 4°C (n = 10) foi 70% superior ao controle (n = 10). O aquecimento a 8°C, por outro lado levou a elevada concentração de proteínas no músculo dos peixes em todos os tempos, com diferença mínima de 64% acima dos valores observados nas temperaturas 0 e 4°C.

O efeito da interação entre tempo e temperatura foi observado no conteúdo proteico em tecidos do fígado e do músculo assim como a interação entre ambos os fatores (Anova de 2 vias).

### 5.3.3 Lipídeos

O conteúdo de lipídeos no fígado aumentou gradativamente nos tempos 96 e 360h em 8°C em relação ao controle (FIGURA 15). Após 96h nesta temperatura (n = 5) a concentração lipídica foi 81% superior ao observado em 0°C (n = 7) e 98% em relação a 4°C. No tempo de 15 dias de aclimação, apesar do reduzido número de indivíduos (n = 2), o conteúdo lipídico no fígado em 8°C foi 164% acima do observado no controle (n = 5) e 105% em relação a 4°C (n = 6).

No músculo, o aquecimento de 4°C levou a elevada concentração de lipídeos em 24h de bioensaio em relação ao controle e a 8°C. Após 360h em 0°C observamos elevada concentração lipídica, consequentemente em ambas as temperaturas elevadas o conteúdo de lipídeos encontrado foi reduzido (FIGURA 15).



**Figura 15** - Conteúdo de lipídeo hepático e muscular do peixe antártico *Notothenia rossii* submetido ao estresse térmico. Os valores representam a média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação aos valores do controle e entre 4°C e 8°C (Teste de Bonferroni -  $P < 0,05$ ). FONTE: O autor (2012).

Tempo e temperatura afetaram a concentração de lipídeos nos tecidos hepáticos e musculares de *N. rossii*, ocorrendo também interação entre ambos os fatores.

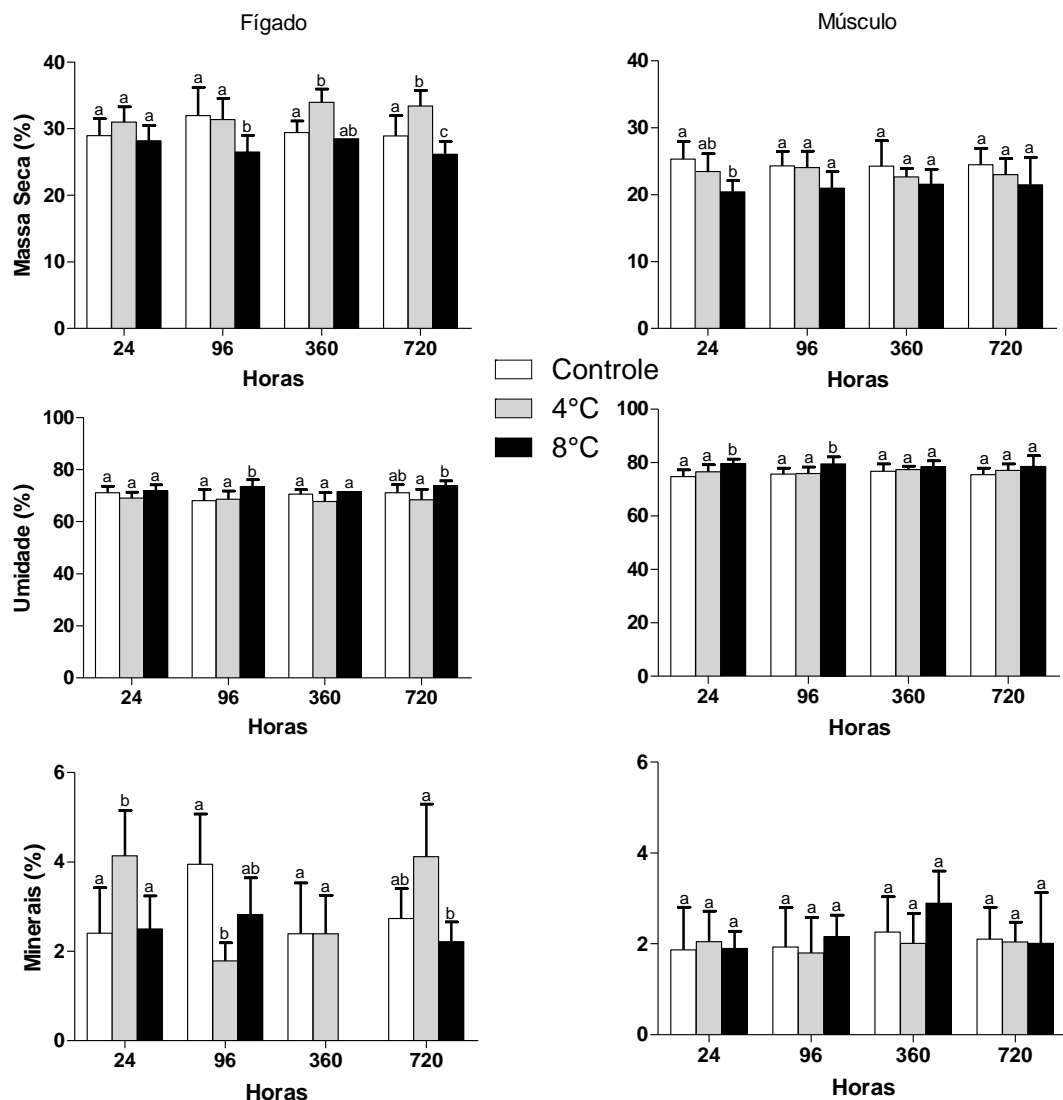
#### 5.3.4 Massa Seca, Umidade e Minerais

O conteúdo de massa seca no fígado de peixes submetidos a 4°C após 360h de aclimação (n = 6) foi 15% superior ao verificado em 0°C (n = 8) e no tempo 720h foi 16% (FIGURA 16). A temperatura de 8°C, por outro lado, provocou a redução dos valores de massa seca do fígado nos tempos 96 e 720h, em relação



aos respectivos controles. O aquecimento em 4 e 8°C, diferente do observado no fígado, não variou o conteúdo de massa seca do músculo acima ou abaixo dos valores de referência (0°C).

A umidade dos tecidos hepáticos aumentou na temperatura de 8°C em relação ao controle e a 4°C em 96 de aclimação e em relação a 4°C após 720h. No músculo, temperatura 8°C provocou aumento da umidade nos tempos 24 e 96h em relação a 0 e 4°C (FIGURA 16).



**Figura 16** – Massa seca, umidade e minerais nos tecidos hepático e muscular do peixe antártico *Notothenia rossii* submetido ao estresse térmico. Os valores representam a média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação aos valores do controle e entre 4°C e 8°C (Teste de Bonferroni -  $P < 0,05$ ).

FONTE: O autor (2012).

De acordo com a figura 16 os valores de minerais no fígado foram afetados pela temperatura 4°C após 24h onde observamos maior concentração em relação a

0°C, de maneira inversa, em 96h (n = 5) esse índice foi 55% inferior ao controle (n = 5).

As análises de massa seca, umidade e minerais nos tecidos do fígado e do músculo dos peixes apresentaram interação entre tempo e temperatura apenas no fígado, nas percentagens de massa seca e minerais. Enquanto o efeito da temperatura não foi verificado apenas nas análises de minerais em tecidos musculares (TABELA 2).

**Tabela 2** - Resultados do teste ANOVA bifatorial para o efeito do tempo, da temperatura e interação entre ambos os fatores sobre massa seca, umidade e minerais no fígado e músculo da *Notothenia rossii* submetida ao estresse térmico (\* P < 0,05 – ns = não significativo).

FONTE: O autor (2012).

ANOVA bifatorial (duas vias) - Massa seca, Umidade e Minerais			
Variáveis	Tempo	Temperatura	Interação
Massa Seca Fígado	ns	*	*
Umidade Fígado	ns	*	ns
Minerais Fígado	ns	*	*
Massa Seca Músculo	ns	*	ns
Umidade Músculo	ns	*	ns
Minerais Músculo	ns	ns	ns

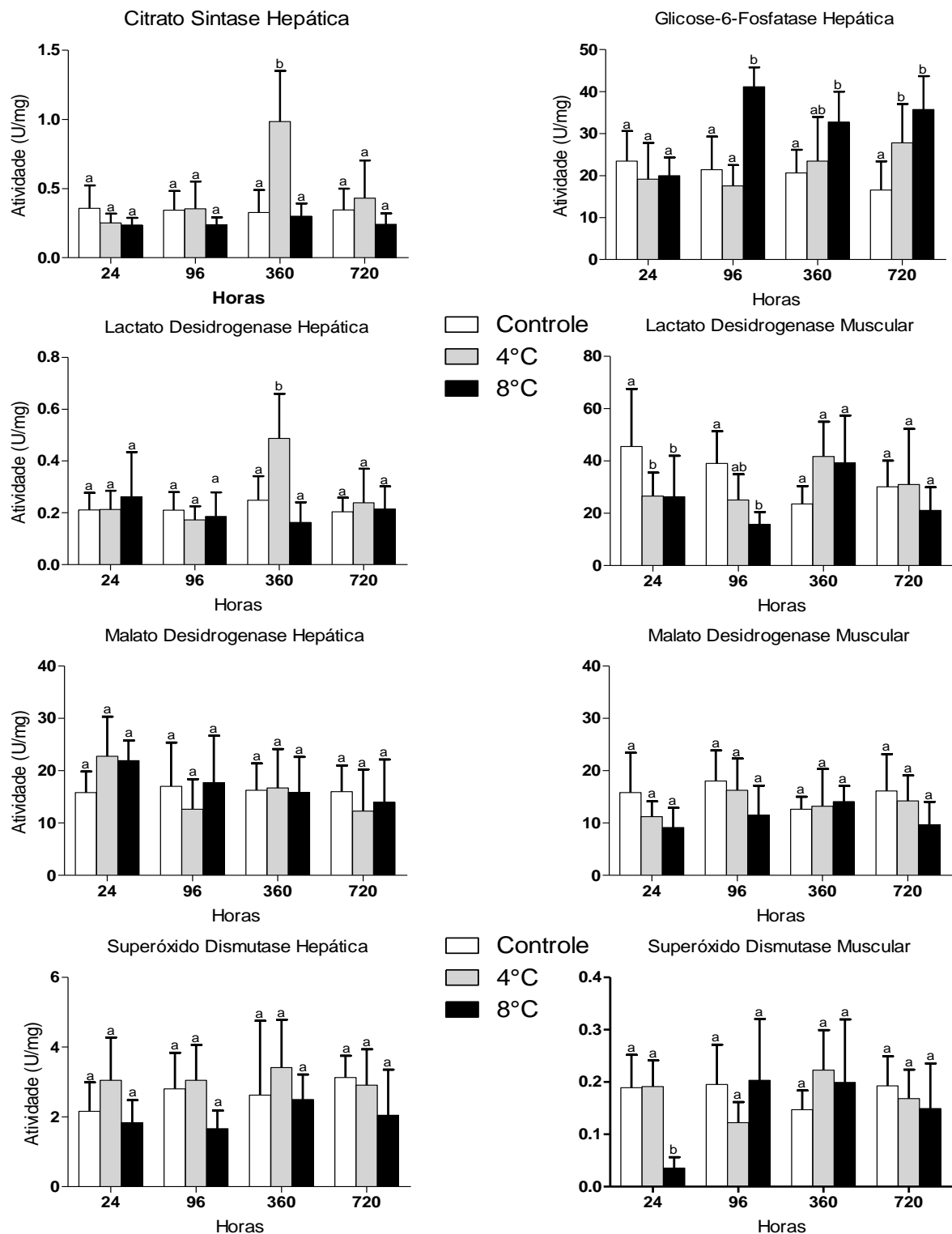
#### 5.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A temperatura 4°C induziu aumento significativo nos níveis hepáticos da CS e da LDH no tempo de 360h e da G6Pase no tempo de 720h. Contudo, o aquecimento em 8°C foi capaz de induzir alterações expressivas nos níveis hepáticos da enzima G6Pase nos tempos de aclimação de 96, 360 e 720h (FIGURA 17).

Os níveis musculares de LDH foram reduzidos em ambas as temperaturas elevadas (4 e 8°C) na aclimação de 24h. O aquecimento em 8°C também foi capaz de induzir redução nos níveis da SOD no tempo 24h e da LDH em 96h.

O efeito do tempo de aclimação foi significativo sobre níveis enzimáticos apenas no fígado, com exceção da SOD hepática. O aquecimento em 4 e 8°C e a

interação entre temperatura e tempo foi importante sobre as variações dos níveis enzimático em ambos os tecidos analisados (TABELA 3).



**Figura 17** – Atividade enzimática dos tecidos hepático e musculares do peixe antártico *Notothenia rossii* submetido ao estresse térmico. Os valores representam a média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação aos valores do controle e entre 4°C e 8°C (Teste de Bonferroni -  $P < 0,05$ ).

FONTE: O autor (2012).

**Tabela 3** - Resultados do teste ANOVA bifatorial para o efeito do tempo, da temperatura e interação entre ambos os fatores sobre a atividade enzimática no fígado e músculo da *Notothenia rossii* submetida ao estresse térmico (\*  $P < 0,05$  – ns = não significativo).

FONTE: O autor (2012).

ANOVA bifatorial (duas vias) - Atividade Enzimática			
Variáveis	Tempo	Temperatura	Interação
Lactato desidrogenase (LDH) hepática	*	*	*
Malato desidrogenase (MDH) hepática	*	ns	ns
Citrato sintase (CS) hepática	*	*	*
Glicose-6-fosfatase (G6Pase) hepática	*	*	*
Superóxido dismutase (SOD) hepática	ns	*	ns
LDH muscular	ns	*	*
MDH muscular	ns	*	ns
SOD muscular	ns	ns	*

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo o peixe *N. rossii* sobreviveu até um mês nas temperaturas de 4°C e 8°C, sendo esta última considerada letal para notothenídeos antárticos (SOMERO e DEVRIES, 1967). Dados ainda não publicados pelo Laboratório de Biologia Adaptativa (UFPR) demonstraram que a *N. rossii*, apesar de adaptada a temperaturas inferiores a 0°C, sobrevive durante 90 dias quando submetida a 8°C, fornecendo indícios de que poderia manter-se nesta condição por um longo período de tempo. Neste trabalho, quando aclimatada a 8°C *N. rossii* foi capaz de expressar regulação hiposmótica e de mobilizar glicogênio hepático através da via gliconeogênica para o controle da glicemia.

O efeito de temperaturas baixas na regulação iônica em peixes ganhou importante atenção na década de 60 e 70, não apenas em peixes do ártico e regiões subárticas, mas também em peixes de águas temperadas. Estes estudos revelaram que a concentração iônica aumenta em peixes marinhos e diminui em alguns peixes de água doce em resposta a redução da temperatura da água (ELIASSEN *et al.*, 1960; HOUSTON e MADDEN, 1968; PROSSER *et al.*, 1970; UMMINGER, 1971).

É importante perceber a elevada osmolaridade de peixes de águas geladas. Nos peixes do ártico a osmolaridade plasmática é aproximadamente 20 a 50 mOsm maior que aquelas observadas em peixes de água temperada. O habitat de peixes antárticos, por outro lado, possui em geral temperaturas inferiores e elevada salinidade em relação ao ártico, ambos os parâmetros com acentuada constância ao longo do ano (O'GRADY *et al.*, 1982). Consequentemente, a osmolaridade plasmática observada em peixes antárticos é de aproximadamente 150 a 200 mOsm maior que a encontrada em peixes marinhos de águas temperadas (DOBBS III e DEVRIES, 1974; O'GRADY *et al.*, 1982).

O primeiro estudo correlacionando aumento da temperatura da água com mecanismos osmorregulatórios em peixes antárticos foi realizado por Franklin e colaboradores (1991), onde a exposição do *P. brochgreivinki* de 0°C para 10°C durante 10 minutos foi um agente estressor capaz de desencadear uma marcada resposta comportamental e fisiológica. Como consequência a exposição a 10°C os autores verificaram um aumento na atividade espontânea, nas taxas de ventilação, na osmolaridade plasmática e na concentração de cloreto no *P. brochgreivinki*. Além

disso, foi observado um escurecimento na pigmentação da pele. Semelhantemente, verificamos na *N. rossii* um aumento da atividade espontânea e do escurecimento da pele, porém, apenas quando submetida a 8°C. O escurecimento da pele em peixes está relacionado ao efeito de estresse (HOGLUND *et al.*, 2000) e pode ser um indicador do efeito danoso da temperatura elevada, especialmente quando correlacionado com aumento nos índices de cortisol. Franklin e colaboradores (1991) verificaram que os peixes voltaram a apresentar a cor normal ao retornar à temperatura de 0°C.

Em ambiente marinho o potencial elétrico transbrânquial é grande e positivo favorecendo a secreção de cátions (POTTS, 1984; KIRSCHNER, 1997), consequentemente, o cloreto é o principal íon transportando ativamente enquanto a secreção de Na<sup>+</sup> é passiva. Desta maneira, a variação na osmolalidade plasmática em teleósteos está intimamente relacionada ao controle da concentração do cloreto plasmático (FERRARIS *et al.*, 1988). Portanto, a redução da concentração do íon cloreto no plasma da *N. rossii* demonstra sua capacidade hipo-osmótica diante de um estresse térmico.

É muito provável que a *N. rossii* tenha sofrido um aumento na concentração de íons e na osmolaridade plasmática após o choque térmico, semelhante ao observado por Franklin e colaboradores (1991) no *P. bronchgrenvinki*. Porém, os parâmetros neste estudo foram analisados em intervalos superiores a 24 horas, tornando impossível o esclarecimento dos fenômenos envolvidos na acomodação inicial à nova temperatura. Portanto, seria interessante analisar o efeito da elevação da temperatura sobre a *N. rossii* em períodos inferiores a 24 horas para obter dados comparáveis com a literatura e ampliar as conclusões do presente estudo. Podemos afirmar, no entanto, que a aclimação em 4°C e 8°C desencadeou resposta hipo-osmorregulatória após 24 horas. Em 8°C a concentração de cloreto continuou sofrendo redução ao longo dos diferentes tempos analisados e as concentrações foram inferiores a 50% daquelas verificadas em 0°C.

Lowe e Davison (2005) verificaram a resposta de teleósteos antárticos diante de um choque térmico e após aclimação em temperaturas elevadas. Eles observaram inicialmente uma resposta hiper-osmótica diante do aumento agudo da temperatura de 3 a 6°C, porém, esta característica é substituída por um comportamento osmorregulador quando os peixes são condicionados à temperatura de 4°C no curso 5 a 6 semanas, semelhante ao verificado no presente estudo. A

aclimação provocou uma redução de 14% na osmolaridade plasmática dos peixes *P. borchgrevinki* e *T. bernacchii*. Estes resultados correlacionam-se com a queda de 18 a 26% na osmolaridade do *T. bernacchii* e *T. newnesi* após aclimação de 4°C durante 5 semanas (GONZALEZ-CABRERA *et al.*, 1995; GUYNN, S. *et al.*, 2002). Ambos Gonzalez-Cabrera *et al.* (1995) e Guynn *et al.* (GUYNN, S. R. *et al.*, 2002) detectaram um aumento na atividade Na/K ATPase branquial após a aclimação, o que pode ter contribuído com a redução da osmolaridade através do aumento da capacidade de excreção do íons Na<sup>+</sup> e redução do Cl<sup>-</sup> sanguíneos.

A realidade hipo-osmótica entre peixes marinhos em relação ao habitat torna necessária a existência de mecanismos para manter este gradiente osmótico entre o organismo e o meio. Bombas iônicas dependente de energia localizada no estômago, brânquias e rins são responsáveis pela regulação da osmolaridade plasmática. Peixes polares, por outro lado, possuem elevada osmolaridade e segundo Prosser *et al.* (1970) esta é uma característica energeticamente favorável pois reduz o conteúdo de energia necessária para manter o gradiente osmótico.

Como questiona O'Grady e DeVries (1982) um gradiente iônico reduzido entre o ambiente e o plasma resultaria no aumento do gradiente iônico através da membrana. A célula gastaria maior conteúdo de energia metabólica para compensar o aumento do gradiente iônico entre o meio intra e extracelular. Consequentemente é possível que o reduzido gradiente observado em peixes polares representa apenas um componente minoritário da energia total necessária para a osmorregulação destes peixes (O'GRADY *et al.*, 1982).

Embora a resistência ao congelamento em peixes polares é, em muitos casos, devido à presença de peptídeos e glicopeptídeos, a osmolaridade total em peixes antárticos representa 30 a 40% da resistência ao congelamento (DUMAN e DEVRIES, 1975). A elevada osmolaridade plasmática observada em peixes antárticos tem, portanto, um importante papel na resistência ao congelamento (O'GRADY *et al.*, 1982). Seria possível então que a capacidade da *N. rossii* em sobreviver a temperaturas acima do limite letal (SOMERO e DEVRIES, 1967) está relacionada com a capacidade em diminuir a resistência ao congelamento oferecida pela osmolaridade sanguínea? Caso a resposta seja afirmativa seria possível explicar por que alguns peixes antárticos não sobrevivem ao aumento da temperatura acima do limite letal, devido a incapacidade de regular sua osmolaridade sanguínea.

A proteinemia indica o estado nutricional e a condição de saúde nos peixes (MISAILA *et al.*, 2009) e este valor normalmente varia entre 35 e 55 g/L em indivíduos saudáveis (SIWICKI *et al.*, 1993). Em 0°C os valores de proteínas totais no plasma foram relacionados a peixes saudáveis, no entanto, a redução verificada na temperatura 4°C (39 g/L) e 8°C (38 g/L) após 30 dias podem indicar o efeito da temperatura sobre a atividade hepática da renovação proteica plasmática, que pode ser devido a baixa absorção alimentar durante o período de exposição (SASTRY e SIDDIQUI, 1983).

A adaptação metabólica ao frio em peixes permanece controversa, especialmente em relação a taxa metabólica (WHITE *et al.*, 2012), por outro lado, a atividade metabólica e a densidade mitocondrial oferecem claro suporte à adaptação metabólica ao frio (MCA). Em estudo recente de abrangência global White *et al.* (2012) demonstraram que a MCA ocorre em diferentes níveis no organismo. Espécies polares e de regiões temperadas evidenciaram o efeito positivo da latitude sobre a taxa de metabolismo padrão, a densidade mitocondrial e a atividade de uma enzima chave no metabolismo – citrato sintase. A latitude não foi utilizada como a causa da variação destas características *per se*, mas, representando uma consolidação das características ambientais.

Os múltiplos papéis da MDH na célula tornam o entendimento da atividade da MDH consideravelmente menos simples, apesar da ausência de inibição ou elevação da sua atividade. Além disso, os resultados da MDH, neste trabalho, representam a combinação da atividade da MDH citosólica e mitocondrial, devido aos métodos para preparação do extrato (homogeneização com o emprego de um copo de vidro e pilão de teflon). No metabolismo aeróbico a MDH catalisa a formação de oxaloacetato no ciclo de Krebs. Como a membrana mitocondrial é impermeável à NADH, em situações anaeróbicas, a MDH citosólica e mitocondrial atuam em conjunto com a cadeia transportadora de elétrons processando equivalentes reduzidos produzidos pela glicólise. A MDH pode ainda catalisar um importante passo da gliconeogênese convencional (TORRES *et al.*, 2012). Portanto, é plausível que a MDH na *N. rossii* atuou na manutenção do equilíbrio redox ou nas diferentes vias metabólicas no interior da célula durante a aclimação, sem para isto alterar seu perfil de atividade (TORRES *et al.*, 2012).

A atividade LDH indicou elevado potencial anaeróbico após 360h de aclimação a 4°C, resultado comum em peixes antárticos submetidos a estresse



térmico (VAN DIJK *et al.*, 1999). Curiosamente na mesma condição experimental a CS também apresentou elevada atividade. No entanto, para afirmar que a *N. rossii* utilizou preferencialmente a via anaeróbica, aeróbica ou que ambas as vias estavam produzindo maior quantidade de ATP seria necessário verificar outras enzimas do metabolismo intermediário, o perfil de expressão das enzimas analisadas e/ou o acúmulo de produtos finais das vias metabólicas.

Peixes teleósteos, como outras espécies ectotérmicas, apresentam um aumento sistêmico da necessidade energética quando submetidos a diferentes formas de estresse, incluindo a exposição aguda e crônica a temperaturas extremas. O aumento da demanda energética possibilita suporte necessário aos fenômenos envolvidos nas respostas para acomodação às novas condições (KINDLE e WHITMORE, 1986; STAURNES *et al.*, 1994; VAN DIJK *et al.*, 1999). Embora teleósteos antárticos utilizem principalmente ácidos graxos para a produção de energia metabólica, diversos tecidos demonstram reduzida capacidade oxidativa de ácidos graxos e utilizam uma ampla variedade de combustíveis energéticos circulantes, especialmente a glicose e o aminoácido glutamato, para atender suas necessidades energéticas (CROCKETT *et al.*, 1999; KAWALL *et al.*, 2002).

Em organismos com circulação sistêmica a principal produção energia química ocorre a nível mitocondrial e a via anaeróbica é secundária na maioria dos tecidos. Em tecidos ricos em mitocôndria a produção de ATP ocorre principalmente através da via aeróbica e a sua utilização é limitada pela cadeia transportadora de elétrons (Hochachka & Somero 2002b apud RODRIGUES *et al.*, 2011).

A glicemia do peixe antártico *P. brachycephalum* permaneceu inalterada quando submetido a um aumento gradual de temperatura entre a faixa térmica de 0 a 6°C, e foi inferior a 1 mM l<sup>-1</sup>. A partir desta temperatura a glicemia foi elevada gradativamente ultrapassando 3 mM quando submetido a 9°C. Esta variação foi acompanhada do acúmulo de produtos finais de vias anaeróbicas, nos tecidos musculares (lactato), hepáticos e cardíacos (succinato) (VAN DIJK *et al.*, 1999).

A glicose plasmática, um indicador geral de estresse, demonstrou comportamentos distintos diante das duas temperaturas as quais a *N. rossii* foi submetida. Em 8°C a glicemia permaneceu elevada em todos os tempos. De acordo com a atividade enzimática é possível afirmar que a G6Pase foi importante para manter a glicemia elevada em 8°C. Possivelmente, a concentração de glicose plasmática nesta temperatura foi mantida a custa do glicogênio hepático em uma

taxa superior à capacidade de reposição do estoque (HOCHACHKA, 1969; NELSON e COX, 2008), colaborando com a afirmação de que hiperglicemia em peixes antárticos sob estresse térmico mobiliza glicogênio hepático (VAN DIJK *et al.*, 1999). Em 4°C enquanto a glicemia sofreu redução em todos os tempos de aclimação e a atividade G6Pase aumentou apenas após 30 dias nesta temperatura. Apesar disto, o conteúdo de glicogênio hepático aumentou após 15 e 30 dias. Para afirmar que a elevada concentração de glicose relacionou-se com o estresse térmico seria interessante verificar o acúmulo de produtos metabólicos ou a atividade de enzimas chaves em tecidos como dos rins e do encéfalo.

Não se tem registros de investigação de mecanismos do controle da glicemia em peixes antárticos, em outros teleósteos embora existam estudos descrevendo o metabolismo da glicose poucos trabalhos buscaram explicar o papel da G6Pase no controle da glicose plasmática, portanto, não existe estudo diretamente comparáveis a esta investigação. Sabe-se que esta enzima juntamente com a GK, podem ser utilizadas em teleósteos para regular a disponibilidade de substrato energético de acordo com o estado nutricional do peixe Caseras *et al.* (2002).

A G6Pase desempenha papel chave na exportação de glicose para o sangue nos hepatócitos através da glicogenólise, (liberação de glicose a partir do glicogênio) e da gliconeogênese (HOCHACHKA, 1969; NELSON e COX, 2008) ou ainda através do Ciclo de Cori, onde o lactato muscular é transformado em glicose no fígado (KATZ e TAYEK, 1999), porém, de acordo com nossos resultados é mais provável que a atividade da G6Pase esteve relacionada ao consumo de glicogênio hepático. Embora verificar seria importante verificar a concentração de lactato plasmático e a atividade de outras enzimas desta via para confirmar o papel gliconeogênico da G6Pase.

Neste trabalho, *N. rossi* quando submetida a 4°C apresentou elevada atividade na G6Pase apenas em 720 h. Neste grupo experimental o conteúdo de glicogênio hepático apresentou queda em sua concentração, contrariando a tendência do acúmulo de glicogênio hepático, conforme observado nos tempos anteriores. Podemos concluir que a G6Pase foi responsável pela exportação hepática de glicose em 720h, porém, a necessidade sistêmica dos organismos foi superior a demanda, pois, a glicemia manteve-se reduzida.

Diversos aspectos colocam os peixes antárticos em contato com elevado conteúdo de ROS. Uma vez que a peroxidação lipídica iniciada por radicais de oxigênio aumenta com o número de duplas ligações dos ácidos graxos (COSGROVE *et al.*, 1987) o conteúdo lipídico altamente insaturado de peixes antárticos pode ser excepcionalmente suscetível a peroxidação lipídica. Neste sentido, alguns aspectos tornam-se verdadeiros desafios aos peixes antárticos: elevada quantidade de oxigênio dissolvido em temperaturas baixas e o abundante conteúdo lipídico, como depósitos de triacilgliceróis em compartimentos intracelulares e as extensas redes de membranas com ácidos graxos poliinsaturados. Além disso, os notothenídeos apresentam preferência metabólica de ácidos graxos, em vez de glicose (EASTMAN e DEVRIES, 1982; EASTMAN, 1993; ANSALDO *et al.*, 2000), o que pode ampliar o potencial de dano oxidativo (ST-PIERRE *et al.*, 2002). O equilíbrio entre o a capacidade antioxidante e o metabolismo oxidativo, garante a proteção de um organismo contra o estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985; CROCKETT, 2011) e em notothenídeos antárticos o equilíbrio é proporcionado pelo eficiente e robusto sistema de defesas antioxidantes (ANSALDO *et al.*, 2000; CROCKETT, 2011).

No presente estudo verificou-se a atividade da SOD que realiza a conversão do ânion  $\cdot\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$ . No entanto, apesar da maioria do  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado nas brânquias se eliminado por simples difusão para a água (WILHELM *et al.*, 1994; ANSALDO *et al.*, 2000) a correta eliminação destas espécies ativas de oxigênio também necessita de um sistema de defesa antioxidante composto pela Catalase (CAT), que converte o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e a glutathione peroxidase (GPx) detoxica ambos,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e hidroperóxidos orgânicos (ROOH), usando glutathione reduzida como cofator. Outros componentes lipossolúveis não enzimáticos, como por exemplo a vitamina E, atuam como aceptores das espécies reativas. Embora o conteúdo de SOD em Notothenídeos antárticos com pigmentos sanguíneos seja inferior ao encontrado em espécies da família Channichthyidae, eles apresentam maior quantidade de CAT e GPx em seu sistema de defesa antioxidante, conforme a teoria da coordenação da expressão de enzimas antioxidantes (HARRIS *et al.*, 1992; CASSINI *et al.*, 1993; ANSALDO *et al.*, 2000). Portanto, qualquer conclusão a respeito das defesas antioxidantes da *N. rossii* e em relação ao estresse térmico, utilizando apenas a atividade da SOD subestimaria o potencial de proteção quanto a espécies reativas.

Contrariando a teoria da alocação (LEVINS, 1968) a *N. rossii*, apesar de ser considerada estenotérmica, sobreviveu à aclimação em temperaturas elevadas acima do limite letal para peixes antárticos. De acordo com a literatura sua sobrevivência em 4°C era esperada, no entanto, ela também sobreviveu 30 dias em 8°C sem morte como resultado do protocolo experimental. *N. rossii* foi capaz de realizar ajustes fisiológicos dependendo da temperatura, no entanto, este comportamento pode não ser representativo da ictiofauna Antártica, sendo necessários estudos com outras espécies visando o estabelecimento ou não de um padrão fisiológico para peixes antárticos.

## 7 CONCLUSÃO

Na literatura há registros de que temperaturas superiores a 5°C são letais para espécies de notothenídeos antárticos. Embora estenotérmico *N. rossii* foi capaz de sobreviver a 8°C durante 30 dias.

*N. rossii* demonstrou capacidade metabólica e fisiológica para atender a elevada demanda energética provocada a 8°C. O potencial gliconeogênico, indicado pelos níveis de G6Pase, foi afetado de forma expressiva apenas em 8°C, revelando que o tecido hepático consegue atender as demandas glicêmicas de *N. rossii* sob temperaturas elevadas.

O estresse térmico em *N. rossii* não alterou expressivamente o potencial aeróbio gerador de ATP do tecido hepático, representado pelos níveis de CS e MDH.

A temperatura de 4°C representa uma barreira para a aclimação de *N. rossii* em estresse térmico onde a modulação enzimática apresentou resposta atrasada. A G6Pase, cuja atividade elevou-se apenas em 720 h, foi importante na exportação hepática de glicose, porém, a necessidade sistêmica dos organismos foi superior a demanda, onde a glicemia, conforme observado nos tempos anteriores, manteve-se reduzida.

A elevação dos níveis de CS e LDH em 360h a 4°C deve ser objeto de novos estudos visando esclarecer possíveis demandas energéticas de *N. rossii* nessa condição específica de estresse térmico.

## REFERÊNCIAS

- ANSALDO, M.; LUQUET, C. M.; EVELSON, P. A.; POLO, J. M.; LLESUY, S. Antioxidant levels from different Antarctic fish caught around South Georgia Island and Shag Rocks. **Polar Biology**, v. 23, n. 3, p. 160-165. 2000.
- ARGAUD, D.; ZHANG, Q.; PAN, W. S.; MAITRA, S.; PILKIS, S. J.; LANGE, A. J. Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states - Gene structure and 5'-flanking sequence. **Diabetes**, v. 45, n. 11, p. 1563-1571. 1996.
- BAANANTE, I. V.; GARCIA DE FRUTOS, P.; BONAMUSA, L.; FERNANDEZ, F. Regulation of fish glycolysis-gluconeogenesis: role of fructose 2,6 P<sub>2</sub> and PFK-2. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 100, n. 1, p. 11-17. 1991.
- BARRERA-ORO, E.; ALESCIO, N.; MOREIRA, E.; MARSCHOFF, E. Using scales to clarify the transition from blue-phase to brown-phase fingerling in *Notothenia rossii* from the South Shetland Islands. **Polar Biology**, v. 33, n. 7, p. 877-884. 2010.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. 4. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2000.
- BIDINOTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 10, p. 53-60. 1997.
- BOTTINO, N. R.; JEFFREY, L. M.; REISER, R. The lipids of Antarctic fish. **Antarctic Journal of the United States**, v. 2, p. 194-195. 1967.
- BRETT, J. R.; GROVES, T. D. 6 Physiological Energetics. In: HOAR, W. S. e RANDALL, D. J. (Ed.). **Fish Physiology**: Academic Press, v. Volume 8, 1979. p.279-352.
- BRODTE, E.; GRAEVE, M.; JACOB, U.; KNUST, R.; PORTNER, H. O. Temperature-dependent lipid levels and components in polar and temperate eelpout (Zoarcidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 261-274. 2008.
- BRODTE, E.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. Temperature-dependent energy allocation to growth in Antarctic and boreal eelpout (Zoarcidae). **Polar Biology**, v. 30, n. 1, p. 95-107. 2006.
- CARPENTER, C. M.; HOFMANN, G. E. Expression of 70 kDa heat shock proteins in antarctic and New Zealand notothenioid fish. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology**, v. 125, n. 2, p. 229-238. 2000.

CASERAS, A.; METON, I.; VIVES, C.; EGEA, M.; FERNANDEZ, F.; BAANANTE, I. V. Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 6, p. 607-614. 2002.

CASSINI, A.; FAVERO, M.; ALBERGONI, V. Comparative studies of antioxidant enzymes in red-blooded and white-blooded antarctic teleost fish *Pagothenia bernacchii* and *Chionodraco hamatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 106, n. 2, p. 333-336. 1993.

CCAMLR. Comission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources 2011. Disponível em: < <http://www.ccamlr.org> >. Acesso em: 08/11/2011.

CHEN, L.; DEVRIES, A. L.; CHENG, C. H. Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 8, p. 3817-22. 1997a.

\_\_\_\_\_. Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 8, p. 3811-6. 1997b.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, n. 3, p. 273-283. 1979.

CHRISTIANSEN, D. C.; KLUNGSOYR, L. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 88, n. 3, p. 701-711. 1987.

CLARKE, A. Life in cold water - the physiological ecology of polar marine ectotherms. **Oceanography and Marine Biology**, v. 21, p. 341-453. 1983.

\_\_\_\_\_. Seasonality in the antarctic marine environment. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 90, n. 3, p. 461-473. 1988.

\_\_\_\_\_. Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 11, p. 573-581. 2003.

CLARKE, A.; MURPHY, E. J.; MEREDITH, M. P.; KING, J. C.; PECK, L. S.; BARNES, D. K. A.; SMITH, R. C. Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 362, n. 1477, p. 149-166. 2007.

COOMBS, S.; MONTGOMERY, J. Function and evolution of superficial neuromasts in an antarctic notothenioid fish. **Brain Behavior and Evolution**, v. 44, n. 6, p. 287-298. 1994.

COSGROVE, J. P.; CHURCH, D. F.; PRYOR, W. A. THE KINETICS OF THE AUTOXIDATION OF POLYUNSATURATED FATTY-ACIDS. **Lipids**, v. 22, n. 5, p. 299-304. 1987.

CRAWFORD, D. L.; PIERCE, V. A.; SEGAL, J. A. Evolutionary physiology of closely related taxa: Analyses of enzyme expression. **American Zoologist**, v. 39, n. 2, p. 389-400. 1999.

CROCKETT, E. L. Antioxidant potential is positively correlated with mitochondrial enzyme activity in Antarctic and non-Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v. 34, n. 1, p. 113-118. 2011.

CROCKETT, E. L.; LONDRAVILLE, R. L.; WILKES, E. E.; POPESCO, M. C. Enzymatic capacities for beta-oxidation of fatty fuels are low in the gill of teleost fishes despite presence of fatty acid-binding protein. **J Exp Zool**, v. 284, n. 3, p. 276-85. 1999.

CROCKETT, E. L.; SIDELL, B. D. Some pathways of energy-metabolism are cold adapted in antarctic fishes. **Physiological Zoology**, v. 63, n. 3, p. 472-488. 1990.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R. A.; GALBRAITH, G. M. P.; BUSE, M. G. The inhibition of islet superoxide-dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, n. 3, p. 235-241. 1981.

DAHLHOFF, E. P. Biochemical indicators of stress and metabolism: Applications for marine ecological studies. **Annual Review of Physiology**, v. 66, p. 183-207. 2004.

DEVLIN, T. M.; MICHELACCI, Y. M. **Manual de bioquímica com correlação clínicas**. 5. São Paulo: Edgard Blücher, 2003.

DEWITT, H. H. Coastal and deep-water benthic fishes of the Antarctic. **Antarctic map folio series Am Geographical Soc**, v. No. 15, p. 1-10. 1971.

DI PRISCO, G. Life style and biochemical adaptation in Antarctic fishes. **Journal of Marine Systems**, v. 27, n. 1-3, p. 253-265. 2000.

DI PRISCO, G.; EASTMAN, J. T.; GIORDANO, D.; PARISI, E.; VERDE, C. Biogeography and adaptation of Notothenioid fish: Hemoglobin function and globin-gene evolution. **Gene**, v. 398, n. 1-2, p. 143-155. 2007.

DOBBS III, G. H.; DEVRIES, A. L. Renal function in Antarctic teleost fishes: Serum and urine composition. **Marine Biology**, v. 29, n. 1, p. 59-70. 1974.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356. 1956.

DUMAN, J. G.; DEVRIES, A. L. Role of macromolecular antifreezes in cold water fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology**, v. 52, n. 1, p. 193-199. 1975.



EASTMAN, J. T. **The evolution of neutrally buoyant notothenioid fishes: their specializations and potential interactions in the Antarctic marine foodweb.** Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg etc., 1985. 430-436

\_\_\_\_\_. The fossil and modern fish faunas of Antarctica: evolution and diversity. In: (Ed.). **Biology of Antarctic fishes:** Springer-Verlag, New York, 1991. p.116-130.

\_\_\_\_\_. **Antarctic Fish Biology - Evolution in a Unique Environment.** San Diego: Academic Press, Inc, 1993. 322

\_\_\_\_\_. The nature of the diversity of Antarctic fishes. **Polar Biology**, v. 28, n. 2, p. 93-107. 2005.

EASTMAN, J. T.; DEVRIES, A. L. Buoyancy studies of notothenioid fishes in McMurdo Sound, Antarctica. **Copeia**, v. 1982, n. 2, p. 385-393. 1982.

EDITH, F.; PEDRO HELIO, L.; METRY, B. The effect of temperature increase on the behaviour of Antarctic fish. **Proc. NIPR Symp. on Polar Biology**, v. 2, p. 123 - 130. 1989.

ELIASSEN, E.; LEIVESTAD, H.; MOLLER, D. Effects of low temperature on the freezing point of plasma and on the potassium/sodium ratio in muscles of some boreal and subarctic fishes. **Arbok Universitetet i Bergen Det Matematisk-Naturitensk**, v. 14, p. 1-24. 1960.

ESCHMEYER, W. N.; FRICKE, R.; FONG, J. D.; POLACK, D. A. Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces). **Zootaxa**, v. 2525, p. 19-50. 2010.

EVERSON, I. **Southern Ocean fisheries survey programme. The living resources of the Southern Ocean.** Rome: FAO, 1977. 160 p.

FATHI, A. R.; KRAUTHEIM, A.; LUCKE, S.; BECKER, K.; STEINFELDER, H. J. Nonradioactive technique to measure protein phosphatase 2A-like activity and its inhibition by drugs in cell extracts. **Analytical Biochemistry**, v. 310, n. 2, p. 208-214. 2002.

FERRARIS, R. P.; ALMENDRAS, J. M.; JAZUL, A. P. Changes in plasma osmolality and chloride concentration during abrupt transfer of milkfish (*Chanos chanos*) from seawater to different test salinities. **Aquaculture**, v. 70, n. 1-2, p. 145-157. 1988.

FISCHER, W.; HUREAU, J. C. **FAO Species Identification Sheets for fishery purposes: Southern Ocean.** Roma: Food and Agriculture Organization of United Nations, 1985.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509. 1957.

FRANKLIN, C. E.; DAVISON, W.; CAREY, P. W. The stress response of an antarctic teleost to an acute increase in temperature. **Journal of Thermal Biology**, v. 16, n. 3, p. 173-177. 1991.

GHISI, N. D.; RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; DE ALMEIDA, M. I. M.; RIBEIRO, C. A. D.; CESTARI, M. M. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, n. 1-4, p. 589-599. 2011.

GIESEG, S. P.; CUDDIHY, S.; HILL, J. V.; DAVISON, W. A comparison of plasma vitamin C and E levels in two Antarctic and two temperate water fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 125, n. 3, p. 371-378. 2000.

GON, O.; HEEMSTRA, P. **Fishes of the Southern Ocean**. Grahamstown, South Africa: J. L. B. Smith Institute of Ichthyology, 1990.

GONZALEZ-CABRERA, P. J.; DOWD, F.; PEDIBHOTLA, V. K.; ROSARIO, R.; STANLEY-SAMUELSON, D.; PETZEL, D. Enhanced hypo-osmoregulation induced by warm-acclimation in antarctic fish is mediated by increased gill and kidney Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities. **Journal of Experimental Biology**, v. 198, n. 11, p. 2279-2291. 1995.

GREVILLE, G. D. Report of the commission of enzymes of the international union of biochemistry (I.U.B. Symposium Series, vol. 20). Pergamon Press, Oxford, 1961. 160 pp., 50s. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 7, p. 153. 1962.

GUYNN, S.; DOWD, F.; PETZEL, D. Characterization of gill Na/K-ATPase activity and ouabain binding in Antarctic and New Zealand nototheniid fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 131, n. 2, p. 363-374. 2002.

GUYNN, S. R.; SCOFIELD, M. A.; PETZEL, D. H. Identification of mRNA and protein expression of the Na/K-ATPase  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- and  $\alpha$ 3-subunit isoforms in Antarctic and New Zealand nototheniid fishes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 273, n. 1, p. 15-32. 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 8, n. 2, p. 89-193. 1985.

HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H. O.; PECK, L. S. Thermal sensitivity of mitochondrial function in the Antarctic Nototheniid *Lepidonotothen nudifrons*. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 169, n. 8, p. 597-604. 1999.

HARDING, M. M.; ANDERBERG, P. I.; HAYMET, A. D. J. 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 7, p. 1381-1392. 2003.

HARRIS, M. L.; SCHILLER, H. J.; REILLY, P. M.; DONOWITZ, M.; GRISHAM, M. B.; BULKLEY, G. B. Free-radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel-disease - cause, consequence or epiphenomenon. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 53, n. 3, p. 375-408. 1992.

HOCHACHKA, P. W. 6 Intermediary Metabolism in Fishes. In: HOAR, W. S. e RANDALL, D. J. (Ed.). **Fish Physiology**: Academic Press, v. Volume 1, 1969. p.351-389.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. The adaptation of enzymes to temperature. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 27, n. 3, p. 659-664. 1968.

\_\_\_\_\_. **Strategies of biochemical adaptation**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1973. 358

HOFFMANN, A. A.; PARSONS, P. A. Evolutionary genetics and environmental stress. In: (Ed.). **Evolutionary genetics and environmental stress**., 1991. p.i.

HOFMANN, B.; HECHT, H. J.; FLOHE, L. Peroxiredoxins. **Biological Chemistry**, v. 383, n. 3-4, p. 347-364. 2002.

HOGLUND, E.; BALM, P. H. M.; WINBERG, S. Skin darkening, a potential social signal in subordinate Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): The regulatory role of brain monoamines and pro-opiomelanocortin-derived peptides. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 11, p. 1711-1721. 2000.

HOUSTON, A. H.; MADDEN, J. A. Environmental temperature and plasma electrolyte regulation in carp *Cyprinus carpio*. **Nature**, v. 217, n. 5132, p. 969. 1968.

HUBOLD, G. Ecology of notothenioid fish in the Weddell Sea. In: (Ed.). **Biology of Antarctic fishes**.: Springer-Verlag, New York, 1991. p.3-22.

HUEY, R. B.; HERTZ, P. E. Is a Jack-of-all-temperatures a master of none. **Evolution**, v. 38, n. 2, p. 441-444. 1984.

JANG, E. H.; PARK, H.; PARK, A. K.; MOON, J. H.; CHI, Y. M.; AHN, I. Y. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the p-class glutathione S-transferase from the Antarctic clam *Laternula elliptica*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 64, n. 12, p. 1132-1134. 2008.

JIN, Y.; DEVRIES, A. L. Antifreeze glycoprotein levels in Antarctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 144, n. 3, p. 290-300. 2006.

JOHNSTON, I. A. Muscle metabolism and growth in Antarctic fishes (suborder Notothenioidei): Evolution in a cold environment. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 4, p. 701-713. 2003.

KATZ, J.; TAYEK, J. A. Recycling of glucose and determination of the Cori Cycle and gluconeogenesis. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 277, n. 3, p. E401-E407. 1999.

KAWALL; KAWALL, H.; TORRES; TORRES, J.; SIDELL; SIDELL, B.; SOMERO; SOMERO, G. Metabolic cold adaptation in Antarctic fishes: evidence from enzymatic activities of brain. **Marine Biology**, v. 140, n. 2, p. 279-286. 2002.

KEELE, B. B.; MCCORD, J. M.; FRIDOVIC.I. Further characterization of bovine superoxide dismutase and its isolation from bovine heart. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 9, p. 2875-&. 1971.

KINDLE, K. R.; WHITMORE, D. H. BIOCHEMICAL INDICATORS OF THERMAL-STRESS IN TILAPIA-AUREA (STEINDACHNER). **Journal of Fish Biology**, v. 29, n. 2, p. 243-255. 1986.

KIRSCHNER, L. B. Extrarenal Mechanisms in Hydromineral and Acid-Base Regulation in Aquatic Vertebrates. In: (Ed.). **Comprehensive Physiology**: John Wiley & Sons, Inc., 1997.

LEVINS, R. **Evolution in Changing Environments: some Theoretical Explorations**. Princeton: Princeton University Press, 1968.

LONDRAVILLE, R. L.; SIDELL, B. D. Ultrastructure of aerobic muscle in antarctic fishes may contribute to maintenance of diffusive fluxes. **Journal of Experimental Biology**, v. 150, p. 205-220. 1990.

LOWE, C. J.; DAVISON, W. Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 3, p. 752-766. 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275. 1951.

LUCASSEN, M.; SCHMIDT, A.; ECKERLE, L. G.; PORTNER, H. O. Mitochondrial proliferation in the permanent vs. temporary cold: enzyme activities and mRNA levels in Antarctic and temperate zoarcid fish. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, n. 6, p. R1410-R1420. 2003.

LUCCHIARI, P. H.; HOSHINO, K.; FANTA, E.; BACILA, M. The effect of temperature on the muscle oxygen levels in Antarctic fish. **Proc. NIPR. Symp. Polar Biol.**, v. 2, p. 117 - 122. 1989.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055. 1969.

METON, I.; CASERAS, A.; FERNANDEZ, F.; BAANANTE, I. V. Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 138, n. 2, p. 145-153. 2004.

METON, I.; EGEA, M.; BAANANTE, I. V. New insights into the regulation of hepatic glucose metabolism in fish. **Recent Research Developments in Biochemistry**, v. 4, n. 1, p. 125-149. 2003.

MINASSIAN, C.; MONTANO, S.; MITHIEUX, G. Regulatory role of glucose-6 phosphatase in the repletion of liver glycogen during refeeding in fasted rats. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v. 1452, n. 2, p. 172-178. 1999.

MISAILA, C.; MISAILA, E. R.; VASILE, G.; ARTENIE, V. Blood glucose, serum proteins levels and superoxide dismutase activity in cyprinus carpio, hypophthalmichthys molitrix and aristichthys nobilis following thermal stress. **Analele Stiintifice ale Universitatii "Al. I. Cuza" din Iasi (Serie Noua) Sectiunea II a Genetica si Biologie Moleculare**, v. 10, n. 1, p. 67-71. 2009.

MONTGOMERY, J.; CLEMENTS, K. Disaptation and recovery in the evolution of Antarctic fishes. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, n. 7, p. 267-271. 2000.

MOON, J. C.; HAH, Y. S.; KIM, W. Y.; JUNG, B. G.; JANG, H. H.; LEE, J. R.; KIM, S. Y.; LEE, Y. M. *et al.* Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin Isotype II that enhances HeLa cell resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 31, p. 28775-28784. 2005.

MOON, T. W. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 129, p. 243-249. 2001.

MORGUNOV, I.; SRERE, P. A. Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase - Substrate channeling of oxaloacetate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 45, p. 29540-29544. 1998.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principios de bioquímica**. 5. New York: Freeman and Company, 2008. 1158p

NORDLIE, R. C.; FOSTER, J. D.; LANGE, A. J. Regulation of glucose production by the liver. **Annual Review of Nutrition**, v. 19, p. 379-406. 1999.

NORTH, A. W. Review of the early life history of Antarctic notothenioid fish. In: (Ed.). **Biology of Antarctic fishes.**: Springer-Verlag, New York, 1991. p.70-86.

O'BRIEN, K. M.; SIDELL, B. D. The interplay among cardiac ultrastructure, metabolism and the expression of oxygen-binding proteins in Antarctic fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 8, p. 1287-1297. 2000.

O'GRADY, S. M.; ELLORY, J. C.; DEVRIES, A. L. Protein and glycoprotein antifreezes in the intestinal fluid of polar fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 98, p. 429-438. 1982.

OGUSUCU, R.; RETTORI, D.; NETTO, L. E. S.; AUGUSTO, O. Superoxide Dismutase 1-mediated Production of Ethanol- and DNA-derived Radicals in Yeasts Challenged with Hydrogen Peroxide Molecular Insights Into the Genome Instability of Peroxiredoxin-null Strains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 9, p. 5546-5556. 2009.

PELLETIER, D.; GUDERLEY, H.; DUTIL, J. D. Effects of growth-rate, temperature, season, and body size on glycolytic enzyme-activities in the white muscle of atlantic cod (*Gadus morhua*). **Journal of Experimental Zoology**, v. 265, n. 5, p. 477-487. 1993.

PORTNER, H. O. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. **Naturwissenschaften**, v. 88, n. 4, p. 137-146. 2001.

\_\_\_\_\_. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology**, v. 132, n. 4, p. 739-761. 2002.

POTTS, W. T. W. Trans-epithelial potentials in fish gills. **Fish Physiology**, v. 10, p. 105-128. 1984.

PROSSER, C. L.; MACKAY, W.; KATO, K. Osmotic and ionic concentrations in some alaskan fish and goldfish from different temperatures. **Physiological Zoology**, v. 43, n. 2, p. 81-&. 1970.

RHEE, S. G.; CHAE, H. Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 12, p. 1543-1552. 2005.

RODRIGUES, E.; SUDA, C. N. K.; RODRIGUES JUNIOR, E.; DE OLIVEIRA, M. F.; CARVALHO, C. D. S.; VANI, G. S. Antarctic Fish Metabolic Responses as Potential Biomarkers of Environmental Impact. **Oecologia Australis**, v. 15, n. 1, p. 124-129. 2011.

SABOROWSKI; SABOROWSKI, R.; BUCHHOLZ; BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, v. 140, n. 3, p. 557-565. 2002.

SANTOVITO, G.; CASSINI, A.; PICCINNI, E. Cu,Zn superoxide dismutase from *Trematomus bernacchii*: Functional conservation and erratic molecular evolution in Antarctic teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 4, p. 444-454. 2006.

SASTRY, K. V.; SIDDIQUI, A. A. Metabolic changes in the snake head fish *Channa punctatus* chronically exposed to endosulfan. **Water Air and Soil Pollution**, v. 19, n. 2, p. 133-141. 1983.

SEEBACHER, F.; DAVISON, W.; LOWE, C. J.; FRANKLIN, C. E. A falsification of the thermal specialization paradigm: compensation for elevated temperatures in Antarctic fishes. **Biology Letters**, v. 1, n. 2, p. 151-154. 2005.

SIDELL, B. D.; CROCKETT, E. L.; DRIEDZIC, W. R. Antarctic fish-tissues preferentially catabolize monoenoic fatty-acids. **Journal of Experimental Zoology**, v. 271, n. 2, p. 73-81. 1995.

SIMÕES, J. C.; ARIGONY-NETO, J.; BREMER, U. F. O uso de mapas antárticos em publicações. **Brazilian Antarctic Research**, v. 4, p. 191-197. 2004.

SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; WALUGA, J. **Fish diseases diagnosis and prevention methods**. Olsztyn, Poland: Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Srodladowego, 1993. 182

SOKOLOVA, I. M.; PÖRTNER, H. O. Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda: Littorinidae) from different latitudes. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 1, p. 195-207. 2003.

SOMERO, G. N. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 139, n. 3, p. 321-333. 2004.

SOMERO, G. N.; DAHLHOFF, E.; LIN, J. J. Stenotherms and eurytherms: mechanisms establishing thermal optima and tolerance ranges. **Society for Experimental Biology Seminar Series**, v. 59, p. 53-78. 1996.

SOMERO, G. N.; DEVRIES, A. L. Temperature tolerance of some antarctic fishes. **Science**, v. 156, n. 3772, p. 257-&. 1967.

SOMERO, G. N.; HOCHACHKA, P. W. Effect of temperature on catalytic and regulatory functions of pyruvate kinases of rainbow trout and antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Biochemical Journal**, v. 110, n. 3, p. 395-&. 1968.

ST-PIERRE, J.; BUCKINGHAM, J. A.; ROEBUCK, S. J.; BRAND, M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 44784-44790. 2002.

STAURNES, M.; RAINUZZO, J. R.; SIGHOLT, T.; JORGENSEN, L. Acclimation of atlantic cod (*Gadus morhua*) to cold-water - stress-response, osmoregulation, gill lipid-composition and gill Na-K-ATPase activity. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology**, v. 109, n. 2, p. 413-421. 1994.

STITT, M. Citrate Synthase (Condensing Enzyme). In: BERGMAYER, H. U., *et al.* (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, v.IV, 1984. p.353-358.

TARGETT, T. E. Trophic ecology and structure of coastal antarctic fish communities. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 4, n. 3, p. 243-263. 1981.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the UK**, v. 85, n. 03, p. 603-611. 2005.

TORRES, J. J.; AARSET, A. V.; DONNELLY, J.; HOPKINS, T. L.; LANCRAFT, T. M.; AINLEY, D. G. Metabolism of antarctic micronektonic crustacea as a function of depth of occurrence and season. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 113, n. 3, p. 207-219. 1994.

TORRES, J. J.; GRIGSBY, M. D.; CLARKE, M. E. Aerobic and anaerobic metabolism in oxygen minimum layer fishes: the role of alcohol dehydrogenase. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 11, p. 1905-1914. 2012.

TORRES, J. J.; SOMERO, G. N. Vertical distribution and metabolism in Antarctic mesopelagic fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 90, n. 3, p. 521-528. 1988.

UMMINGER, B. L. Patterns of osmoregulation in freshwater fishes at temperatures near freezing. **Physiological Zoology**, v. 44, n. 1, p. 20-&. 1971.

VAN DE WERVE, G.; LANGE, A.; NEWGARD, C.; MECHIN, M. C.; LI, Y. Z.; BERTELOOT, A. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 6, p. 1533-1549. 2000.

VAN DIJK, P. L. M.; TESCH, C.; HARDEWIG, I.; PORTNER, H. O. Physiological disturbances at critically high temperatures: A comparison between stenothermal Antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 202, n. 24, p. 3611-3621. 1999.

WALESBY, N. J.; JOHNSTON, I. A. Activities of some enzymes of energy metabolism in the fast and slow muscles of an Antarctic teleost fish (*Notothenia rossii*). **Biochemical Society Transactions**, v. 7, n. 4, p. 659-661. 1979.

WEINHOUSE, S. Regulation of glucokinase in liver. **Curr Top Cell Regul**, v. 11, p. 1-50. 1976.

WHITE, C. R.; ALTON, L. A.; FRAPPELL, P. B. Metabolic cold adaptation in fishes occurs at the level of whole animal, mitochondria and enzyme. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 279, n. 1734, p. 1740-1747. 2012.



WILHELM, D.; GONZALEZFLECHA, B.; BOVERIS, A. GILL DIFFUSION AS A PHYSIOLOGICAL MECHANISM FOR HYDROGEN-PEROXIDE ELIMINATION BY FISH. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 12, p. 2879-2882. 1994.

WILSON, R. P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. **Aquaculture**, v. 124, n. 1-4, p. 67-80. 1994.

WILSON, R. S.; FRANKLIN, C. E. Testing the beneficial acclimation hypothesis. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 2, p. 66-70. 2002.

WILSON, R. S.; KUCHEL, L. J.; FRANKLIN, C. E.; DAVISON, W. Turning up the heat on subzero fish: thermal dependence of sustained swimming in an Antarctic notothenioid. **Journal of Thermal Biology**, v. 27, n. 5, p. 381-386. 2002.

WITAS, H.; GABRYELAK, T.; MATKOVICS, B. Comparative studies on superoxide dismutase and catalase activities in livers of fish and other antarctic vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 409-411. 1984.

WOO, H. A.; CHAE, H. Z.; HWANG, S. C.; YANG, K. S.; KANG, S. W.; KIM, K.; RHEE, S. G. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 653-656. 2003.

WOOD, Z. A.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 650-653. 2003.

ANEXO I – TABELAS DE RESULTADOS

Constituinte	0	Horas de bioensaio															
		24				96				360				720			
		Contolole	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C			
Albumina	(g/L)	0.3 ± 0.21	0.6 ± 0.05 (100)*	0.2 ± 0.04 (-67)**	0.1 ± 0.02 (-83)**	0.2 ± 0.02 (-33)*	0.1 ± 0.01 (-50)**	0.2 ± 0.03 (0)**	0.1 ± 0.01 (-67)*	0.1 ± 0.02 (0)**	0.2 ± 0.02 (100)**	0.2 ± 0.01 (-33)*	0.1 ± 0.02 (-50)**	0.3 ± 0.07 (50)**			
Glicose	(mM)	2,3 ± 0,77	2,0 ± 1,02 (-12)*	2,4 ± 0,83 (17)**	6,3 ± 2,36 (210)**	3,3 ± 1,16 (42)*	1,7 ± 0,29 (-48)**	4,5 ± 0,94 (36)**	2,2 ± 0,49 (-6)*	0,9 ± 0,29 (-57)**	4,7 ± 1,53 (116)**	1,6 ± 0,42 (-31)*	0,4 ± 0,24 (-73)**	2,9 ± 0,86 (82)**			
Triglicérideos	(g/L)	18.2 ± 4.30	8.4 ± 4.49 (-54)*	13.5 ± 4.17 (61)**	15.7 ± 5.13 (87)**	6.9 ± 4.28 (-62)*	9.9 ± 4.96 (43)**	14.1 ± 2.81 (104)**	17.4 ± 7.02 (-4)*	25.38 ± 10.07 (46)**	48.8 ± 17.99 (180)**	16.1 ± 8.35 (-12)*	14.3 ± 6.42 (-11)**	10.0 ± 1.71 (-38)**			
Hemoglobina	(g/L)	58.7 ± 7.08	59.0 ± 6.86 (1)*	51.0 ± 7.04 (-14)**	59.0 ± 20.95 (0)**	64.2 ± 6.10 (9)*	53.4 ± 7.15 (-17)**	73.5 ± 18.15 (14)**	63.2 ± 11.90 (8)*	57.5 ± 6.83 (-9)**	102.0 ± 20.01 (691)**	47.6 ± 11.10 (-19)*	56.7 ± 9.03 (19)**	67.3 ± 12.70 (41)**			
Cloro	(mM)	290 ± 124	343 ± 41 (18)*	169 ± 9 (-51)**	82 ± 13 (-76)**	195 ± 34 (-33)*	162 ± 10 (-17)**	60 ± 7 (-69)**	162 ± 23 (-44)*	158 ± 14 (-2)**	ND	175 ± 11 (-40)*	144 ± 13 (-18)**	45 ± 2 (-74)**			
Cálcio	(mM)	2.7 ± 0.17	2.4 ± 0.17 (-11)*	2.4 ± 0.14 (0)**	3.0 ± 0.25 (25)**	2.3 ± 0.17 (-15)*	3.0 ± 0.13 (30)**	3.4 ± 0.47 (48)**	2.6 ± 0.08 (-4)*	2.7 ± 0.17 (4)**	5.0 ± 0.56 (92)**	2.8 ± 0.25 (4)*	2.3 ± 0.33 (-18)**	3.2 ± 0.47 (14)**			
Proteínas totais	(g/L)	76.2 ± 34.28	55.4 ± 11.65 (-27)*	36.6 ± 6.51 (-29)**	42.3 ± 9.68 (-24)**	58.5 ± 5.91 (-23)*	29.8 ± 3.67 (-49)**	48.8 ± 4.8 (-17)**	41.8 ± 10.44 (-45)*	42.0 ± 5.76 (0)**	48.7 ± 5.17 (16)**	59.5 ± 11.48 (-22)*	39.6 ± 5.87 (-33)**	34.5 ± 14.49 (-42)**			
Colesterol	(mM)	5.28 ± 0.91	4.4 ± 1.23 (-17)*	5.4 ± 0.67 (22)**	5.2 ± 0.98 (19)**	4.5 ± 0.52 (-14)*	4.1 ± 0.64 (-10)**	3.7 ± 0.63 (-18)**	4.4 ± 0.50 (-17)*	5.1 ± 0.79 (16)**	4.8 ± 0.55 (11)**	3.7 ± 0.92 (-30)*	4.1 ± 0.59 (11)**	3.4 ± 0.56 (-9)**			
Magnésio	(mM)	1.1 ± 0.20	0.9 ± 0.29 (-13)*	1.3 ± 0.10 (35)**	1.1 ± 0.23 (14)**	0.5 ± 0.28 (-59)*	0.7 ± 0.14 (60)**	1.2 ± 0.43 (158)**	0.9 ± 0.26 (-21)*	1.2 ± 0.12 (38)**	1.1 ± 0.39 (23)**	0.4 ± 0.14 (-68)*	0.6 ± 0.24 (63)**	0.7 ± 0.14 (95)**			

Constituinte	0	Horas de bioensaio												
		24			96			360			720			
		Contolole	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C
Glicogênio Fígado	(nmols/g)	350 ± 141	637 ± 107 (82)*	285 ± 126 (-55)**	130 ± 24 (-80)**	534 ± 124 (53)*	349 ± 93 (-35)**	177 ± 34 (-67)**	523 ± 101 (50)*	639 ± 152 (22)**	101 ± 24 (-81)**	480 ± 240 (37)*	582 ± 135 (21)**	185 ± 37 (-61)**
Lípídeos Fígado	(%)	3,6 ± 0,45	2,3 ± 0,88 (-37)*	3,4 ± 2,02 (40)**	1,7 ± 0,51 (-26)**	1,1 ± 0,45 (-61)*	1,7 ± 0,43 (45)**	1,4 ± 0,33 (24)**	3,6 ± 0,69 (0)*	1,4 ± 0,80 (-61)**	1,3 ± 0,31 (-64)**	1,5 ± 0,63 (-58)*	1,3 ± 0,30 (-13)**	1,2 ± 0,22 (-21)**
Proteínas Fígado	(%)	36,0 ± 6,34	35,4 ± 5,41 (-2)*	46,3 ± 9,31 (23)**	31,1 ± 6,82 (-12)**	28,0 ± 4,94 (-22)*	36,0 ± 5,98 (28)**	38,1 ± 3,23 (36)**	30,9 ± 3,57 (-14)*	25,2 ± 4,43 (-19)**	46,5 ± 3,49 (51)**	34,7 ± 5,86 (-3)*	34,0 ± 6,06 (-2)**	34,7 ± 9,94 (6)**
Massa Úmida Fígado	(%)	70,6 ± 4,25	71,1 ± 2,54 (1)*	69,0 ± 2,30 (-3)**	71,8 ± 2,32 (1)**	68,0 ± 4,22 (-4)*	68,6 ± 3,14 (1)**	73,5 ± 2,5 (8)**	70,6 ± 1,72 (0)*	67,7 ± 3,53 (-4)**	71,5 ± ND (1)**	71,1 ± 3,09 (1)*	68,3 ± 4,03 (-4)**	73,8 ± 1,90 (4)**
Massa Seca Fígado	(%)	29,4 ± 4,25	28,9 ± 2,54 (-2)*	31,0 ± 2,30 (7)**	28,2 ± 2,32 (-3)**	32,0 ± 4,22 (9)*	31,4 ± 3,14 (-2)**	26,5 ± 2,50 (-17)**	29,4 ± 1,72 (0)*	34,0 ± 1,96 (15)**		28,9 ± 3,09 (-2)*	33,4 ± 2,33 (16)**	26,2 ± 1,90 (-9)**
Minerais Fígado	(%)	2,49 ± 0,77	2,41 ± 1,02 (-3)*	4,14 ± 1,02 (72)**	2,50 ± 0,74 (4)**	3,95 ± 1,13 (58)*	1,79 ± 0,40 (-55)**	2,82 ± 0,83 (-29)**	2,40 ± 1,14 (-4)*	2,39 ± 0,86 (0)**		2,74 ± 0,67 (10)*	4,12 ± 1,18 (52)**	2,22 ± 0,44 (-19)**
Glicogênio Músculo	(nmols/g)	17,3 ± 1,39	15,8 ± 1,57 (-8)*	10,2 ± 3,51 (-35)**	7,7 ± 1,14 (-51)**	13,2 ± 2,21 (-24)*	7,4 ± 3,05 (-44)**	7,7 ± 3,12 (-41)**	15,4 ± 2,46 (-11)*	6,7 ± 2,22 (-57)**	8,3 ± 139 (-46)**	13,0 ± 4,46 (-25)*	8,8 ± 3,9 (-32)**	6,7 ± 0,77 (-48)**
Lípídeos Músculo	(%)	4,25 ± 0,87	3,75 ± 1,00 (-12)*	5,15 ± 0,98 (38)**	4,33 ± 2,04 (16)**	3,56 ± 1,65 (-16)*	3,27 ± 0,78 (-8)**	6,46 ± 3,44 (81)**	3,77 ± 1,30 (-11)*	4,87 ± 1,37 (29)**	9,95 ± 5,59 (164)**	3,45 ± 1,35 (-19)*	4,46 ± 1,37 (29)**	3,82 ± 1,31 (11)**
Proteínas Músculo	(%)	17,2 ± 4,31	12,6 ± 3,44 (26)*	16,0 ± 4,84 (27)**	34,1 ± 4,21 (170)**	10,3 ± 2,36 (-10)*	13,5 ± 2,05 (31)**	37,8 ± 2,73 (268)**	20,6 ± 9,57 (20)*	11,9 ± 2,73 (-42)**	33,8 ± 2,22 (64)**	8,6 ± 1,65 (50)*	14,6 ± 4,48 (70)**	35,6 ± 3,31 (313)**
Massa Úmida Músculo	(%)	77,0 ± 1,74	7,47 ± 2,63 (-3)*	76,5 ± 2,63 (2)**	79,6 ± 1,71 (7)**	75,7 ± 2,15 (-2)*	76,0 ± 2,43 (0)**	79,5 ± 2,61 (5)**	76,7 ± 2,74 (0)*	77,4 ± 1,24 (1)**	78,5 ± 2,26 (6)**	75,6 ± 2,43 (-2)*	77,0 ± 2,40 (2)**	78,6 ± 4,08 (4)**
Massa Seca Músculo	(%)	23,0 ± 1,74	25,3 ± 2,63 (10)*	23,5 ± 2,63 (-7)**	20,4 ± 1,71 (-19)**	24,3 ± 2,15 (6)*	24,0 ± 2,43 (-1)**	20,5 ± 2,61 (-16)**	23,3 ± 2,74 (1)*	22,6 ± 1,28 (-3)**	21,5 ± 2,26 (-7)**	24,4 ± 2,43 (6)*	23,0 ± 2,40 (-6)**	21,4 ± 4,08 (-12)**
Minerais Músculo	(%)	1,71 ± 0,98	1,87 ± 0,94 (9)*	2,05 ± 0,67 (10)**	1,90 ± 0,38 (2)**	1,93 ± 0,87 (13)*	1,80 ± 0,79 (-7)**	2,16 ± 0,47 (12)**	2,26 ± 0,78 (32)*	2,01 ± 0,66 (-11)**	2,89 ± 0,71 (28)**	2,10 ± 0,71 (23)*	2,04 ± 0,44 (-3)**	2,01 ± 1,12 (-4)**

Constituinte	0	Horas de bioensaio															
		24				96				360				720			
		Contolole	Controle		4°C	8°C	Controle		4°C	8°C	Controle		4°C	8°C	Controle		4°C
G6Pase	U/mg	24,6 ± 5,94	23,4 ± 7,17	(-5)*	19,1 ± 8,64 (-18)**	19,9 ± 4,40 (-15)**	21,4 ± 7,88 (-13)*	17,5 ± 4,96 (-18)**	41,2 ± 4,56 (92)**	20,6 ± 5,52 (-16)*	23,5 ± 10,52 (14)**	32,8 ± 7,18 (59)**	16,6 ± 6,82 (-33)*	27,8 ± 9,25 (68)**	35,7 ± 7,97 (115)**		
CS	U/mg	0,4 ± 0,08	0,4 ± 0,2	(-1)*	0,3 ± 0,07 (-37)**	0,2 ± 0,05 (-41)**	0,3 ± 0,14 (-15)*	0,4 ± 0,2 (3)**	0,2 ± 0,05 (-30)**	0,3 ± 0,16 (-19)*	1,0 ± 0,37 (201)**	0,3 ± 0,14 (4)**	0,3 ± 0,16 (-15)*	0,4 ± 0,27 (25)**	0,2 ± 0,08 (-30)**		
LDH fígado	U/mg	0,21 ± 0,1	0,21 ± 0,7	(-1)*	0,21 ± 0,7 (1)**	0,26 ± 0,17 (25)**	0,21 ± 0,07 (-2)*	0,17 ± 0,05 (-18)**	0,19 ± 0,09 (-11)**	0,25 ± 0,09 (16)*	0,49 ± 0,17 (96)**	0,16 ± 0,08 (-34)**	0,20 ± 0,05 (-4)*	0,24 ± 0,13 (17)**	0,22 ± 0,09 (5)**		
MDH fígado	U/mg	13,5 ± 4,70	15,8 ± 4,04	(17)*	22,8 ± 7,56 (44)**	21,9 ± 3,88 (39)**	17,0 ± 8,37 (26)*	12,6 ± 5,74 (-26)**	17,7 ± 9,00 (4)**	16,3 ± 5,08 (20)*	16,7 ± 7,42 (3)**	15,9 ± 6,71 (-2)**	16,0 ± 5,00 (18)*	12,3 ± 7,98 (-23)**	14,0 ± 8,18 (-13)**		
SOD fígado	U/mg	2,4 ± 0,72	2,2 ± 0,83	(-10)*	3 ± 1,23 (41)**	1,8 ± 0,65 (-15)**	2,8 ± 1,03 (16)*	3,0 ± 1,02 (9)**	1,7 ± 0,52 (-41)**	2,6 ± 2,13 (9)*	3,4 ± 1,37 (30)**	2,5 ± 0,71 (-5)**	3,1 ± 0,62 (30)*	2,9 ± 1,04 (-7)**	2,0 ± 1,30 (-35)**		
LDH músculo	U/mg	35,1 ± 19,51	35,5 ± 14,12	(1)*	28,1 ± 8,28 (-21)**	29,0 ± 4,83 (-18)**	39,1 ± 12,29 (11)*	25,1 ± 9,82 (-36)**	15,8 ± 4,71 (-60)**	23,6 ± 6,81 (-33)*	41,8 ± 13,17 (77)**	39,3 ± 18,02 (66)**	30,1 ± 10,08 (-14)*	31,0 ± 21,24 (3)**	21,1 ± 8,83 (-30)**		
MDH músculo	U/mg	13,7 ± 8,29	15,8 ± 7,64	(16)*	11,2 ± 2,92 (-29)**	9,1 ± 3,78 (42)**	18,0 ± 5,85 (32)*	16,3 ± 6,02 (-10)**	11,6 ± 5,58 (-36)**	12,6 ± 2,40 (8)*	13,2 ± 7,12 (5)**	14,1 ± 3,04 (12)**	16,1 ± 7,05 (18)*	14,3 ± 4,84 (-12)**	9,7 ± 4,39 (-40)**		
SOD músculo	U/mg	0,17 ± 0,06	0,19 ± 0,06	(12)*	0,19 ± 0,05 (1)**	0,04 ± 0,02 (-81)**	0,20 ± 0,08 (16)*	0,12 ± 0,04 (-37)**	0,20 ± 0,12 (4)**	0,15 ± 0,04 (-13)*	0,22 ± 0,08 (51)**	0,20 ± 0,12 (35)**	0,19 ± 0,06 (14)*	0,17 ± 0,05 (-13)**	0,15 ± 0,09 (-23)**		

\* Porcentagem acima ou abaixo do controle 2  
\*\* Porcentagem acima ou abaixo do experimental em relação ao respectivo controle

## ANEXO II – TABELA COM O n AMOSTRAL EM CADA ANÁLISE

Constituinte Plasmático	Horas de bioensaio												
	0	24			96			360			720		
	Controle 2	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C
Albumina	10	9	10	10	9	10	10	7	10	10	10	10	9
Glicose	10	10	10	8	9	10	9	7	10	10	10	10	8
Triglicerídeos	10	10	10	10	9	10	10	7	10	10	10	10	9
Hemoglobina	10	10	10	7	9	10	10	7	10	4	10	10	9
Cloro	5	10	10	10	9	10	10	7	9	--	10	10	9
Cálcio	10	10	10	8	9	10	10	6	10	10	10	10	9
Proteínas totais	10	10	10	10	9	10	10	7	10	10	10	10	9
Colesterol	10	10	10	10	9	10	10	7	10	10	10	10	9
Magnésio	10	10	10	10	9	10	10	7	10	10	10	10	9

Análise	Horas de bioensaio												
	0	24			96			360			720		
	Controle 2	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C
Glicogênio Fígado	10	8	10	7	7	10	7	7	5	7	10	6	7
Lípídeos Fígado	10	7	10	5	7	6	5	6	9	5	8	7	6
Proteínas Fígado	10	9	10	9	9	8	6	7	10	5	10	10	8
Massa Úmida Fígado	10	9	7	9	8	6	7	8	8	1	6	8	6
Massa Seca Fígado	10	9	7	9	8	6	7	8	6	0	6	5	6
Minerais Fígado	6	6	6	10	5	5	7	8	6	0	5	5	7
Glicogênio Músculo	7	7	9	8	6	9	8	6	7	7	8	9	6
Lípídeos Músculo	7	8	10	8	7	8	5	5	6	2	6	6	6
Proteínas Músculo	10	9	10	10	8	10	9	6	9	8	10	10	8
Massa Úmida Músculo	9	8	10	8	5	10	8	7	7	6	9	10	5
Massa Seca Músculo	9	8	10	8	5	10	8	7	7	6	9	10	5
Minerais Músculo	10	9	7	8	5	6	8	7	7	6	7	6	5

Enzima	Horas de bioensaio												
	0	24			96			360			720		
	Controle 2	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C	Controle	4°C	8°C
G6Pase	8	9	8	8	8	7	8	7	7	7	8	7	7
CS	7	9	8	8	8	7	8	6	6	8	7	7	7
LDH fígado	8	9	8	8	8	7	8	7	7	8	8	7	7
MDH fígado	8	9	8	8	8	7	8	7	7	7	8	7	7
SOD fígado	7	9	8	8	8	7	8	6	6	8	7	7	7
LDH músculo	7	6	8	7	7	8	8	7	7	7	8	8	7
MDH músculo	8	8	9	8	7	8	8	7	7	7	8	8	7
SOD músculo	7	9	8	8	8	7	8	6	6	8	7	7	7